MICROBIOLOGIA:
Clínica, Ambiental e Alimentos
Renan Monteiro do Nascimento
(Organizador)
Atena
Editora
Ano 2021

Microbiologia:

Clínica, Ambiental e Alimentos

Renan Monteiro do Nascimento
(Organizador)

Ano 2021

Editora Chefe
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Assistentes Editoriais
Natalia Oliveira
Bruno Oliveira
Flávia Roberta Barão
Bibliotecária
Janaina Ramos
Projeto Gráfico e Diagramação
Natália Sandrini de Azevedo
Camila Alves de Cremo
Luiza Alves Batista
Maria Alice Pinheiro
Imagens da Capa
Shutterstock
Edição de Arte
Luiza Alves Batista
Revisão
Os Autores

Atena
Editora

Ciências Biológicas e da Saúde

Microbiologia: clínica, ambiental e alimentos

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Bibliotecária: Janaina Ramos
Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Giovanna Sandrini de Azevedo
Edição de Arte: Luiza Alves Batista
Revisão: Os Autores
Organizador: Renan Monteiro do Nascimento

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M626 Microbiologia: clínica, ambiental e alimentos / Organizador Renan Monteiro do Nascimento. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-5706-754-3
DOI 10.22533/at.ed.543210120

1. Microbiologia. I. Nascimento, Renan Monteiro do (Organizador). II. Título.

CDD 579

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa.

Ano 2021

APRESENTAÇÃO

A coleção “Microbiologia: Clínica, Ambiental e Alimentos” é uma obra que tem como foco principal a apresentação de trabalhos científicos diversos que compõe seus capítulos relacionados aos microrganismos. O volume apresenta um compilado de 15 artigos distribuídos em temáticas que abordam de forma categorizada e interdisciplinar trabalhos, pesquisas, relatos de casos e/ou revisões que transitam nas diversas áreas de aplicação da Microbiologia.

O objetivo central desta coletânea é apresentar de forma categorizada e clara estudos desenvolvidos em diversas instituições de ensino e pesquisa do país. Em todos esses trabalhos a linha condutora foi o aspecto relacionado à Bacteriologia, Micologia, Parasitologia, Virologia, Imunologia Biotecnologia, Saúde Pública e áreas correlatas.

O avanço tecnológico tem contribuído com inúmeras pesquisas relacionadas à biologia dos diversos microrganismos existentes, e consequentemente, esses estudos podem auxiliar na prevenção e no combate a patologias/doenças que podem afetar a saúde humana e dos demais seres vivos.

Temas diversos e interessantes são deste modo, discutidos aqui com a proposta de fundamentar o conhecimento de acadêmicos, mestres, doutores e todos aqueles que de alguma forma se interessam pelas ciências biológicas e pelas ciências da saúde em seus aspectos microbiológicos. Possuir um material que demonstre a aplicação dos microrganismos em várias áreas do conhecimento, de forma temporal e com dados substanciais de regiões específicas do país tem sido relevante, bem como, abordar temas atuais e de interesse direto da sociedade.

Este livro “Microbiologia: Clínica, Ambiental e Alimentos” apresenta uma teoria bem fundamentada nos resultados práticos obtidos pelos diversos pesquisadores, professores e acadêmicos que arduamente desenvolveram seus estudos que aqui estão apresentados de maneira concisa e didática. Sabemos o quão importante é a divulgação científica, por isso evidenciamos também a estrutura da Atena Editora, que é capaz de oferecer uma plataforma consolidada e confiável, permitindo que esses pesquisadores exponham e divulguem seus trabalhos.

Desejo a todos uma ótima leitura.

Renan Monteiro do Nascimento

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE MOLHO DE TUCUPI PRETO E MOLHO SHOYU

Data de aceite: 19/01/2021

Clara Noelly Pimentel da Silva
http://lattes.cnpq.br/1800878492959071

Amanda Lima Tvares
http://lattes.cnpq.br/0170474731653275

Marcelly Monteiro Martins
http://lattes.cnpq.br/3866260941068661

Regiane Soares Ramos
http://lattes.cnpq.br/1265425685122656

Vitoria Micaely Torres Carvalho
http://lattes.cnpq.br/5130731160696868

RESUMO: A mandioca ocupa um lugar de destaque na dieta alimentar da população do estado do Pará, sendo consumida principalmente na forma de farinha, mas também é utilizada como matéria-prima para elaboração de diversos pratos típicos. O processo de fabricação do tucupi varia de produtor para produtor, bem como a variedade da mandioca utilizada no processo de extração da manipueira. Assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma analise físico-química e microbiológica deste produto que é inovador, já que o mesmo se caracteriza como molho para utilização em receitas culinárias e, assim comparar o mesmo com um molho ja presente no mercado. Como resultado, o que se refere ao sódio, é possível observar que para os dois molhos analisados o molho shoyu apresentou 692,0 mg/100g, estando assim, dentro do valor referência de tolerância de ± 20% de acordo com a Resolução ANVISA RDC nº 360 de 23/12/2003, retificada em 12/06/2013 pelo DOU nº 111, seção 1, pg. 37 em relação ao valor declarado no rótulo sendo de 818 mg de sódio/1 colher de sopa. O tucupi preto apresentou também, um resultado positivo do valor contido em sua informação nutricional que é de 154 mg de sódio/1 colher de sopa. Assim, verifica-se que não ocorreu divergências, porém deve ser mais pesquisada, em estudos futuros para confirmação desses resultados. A partir do exposto é possível concluir que o molho de tucupi preto e o molho shoyu tiveram grande diferença nas análises físico-químicas, ressaltando o menor teor de sódio do tucupi, onde de se teve a maior discrepância quando comparados os molhos, porém com resultados de análises microbiológicas parecidos. Assim, os dois apresentam boas características e que podem sim, ser utilizados como molho nas preparações.

PALAVRAS-CHAVE: Tucupi Preto. Molho Shoyu. Caracterização.

ABSTRACT: Cassava occupies a prominent place in the diet of the population of the state of Pará, being consumed mainly in the form of flour, but it is also used as a raw material for the preparation of various typical dishes. The tucupi manufacturing process varies from producer to producer, as well as the variety of cassava used in the manipueira extraction process. Thus, the present work aimed to carry out a physical-chemical and microbiological analysis of this innovative product, since it is characterized as a sauce for use in culinary recipes and, thus, to

compare it with a sauce already present on the market. As a result, with regard to sodium, it is possible to observe that for the two analyzed sauces the shoyu sauce presented 692.0 mg / 100g, thus being within the reference value of ± 20% according to ANVISA RDC Resolution 360 of 12/23/2003, rectified on 06/12/2013 by DOU nº 111, section 1, pg. 37 in relation to the declared value on the label being 818 mg of sodium / 1 tablespoon. The black tucupi also presented a positive result of the value contained in its nutritional information, which is 154 mg of sodium / 1 tablespoon. Thus, it appears that there were no divergences, but it should be further researched in future studies to confirm these results. From the foregoing it is possible to conclude that the black tucupi sauce and the soy sauce had a great difference in the physical-chemical analysis, highlighting the lower sodium content of the tucupi, where the greatest discrepancy was found when comparing the sauces, but with results similar microbiological analyzes. Thus, both have good characteristics and can be used as a sauce in the preparations.
KEYWORDS: Black Tucupi. Shoyu sauce. Description.

1 I INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pode ser utilizada diretamente para o consumo ou destinada para a indústria na fabricação de farinha e fécula. Ela apresenta um lugar de destaque na dieta alimentar da população do Estado do Pará, sendo consumida como matéria-prima para elaboração de diversos pratos típicos (CASSONI, 2008). Assim, uma empresa dentro do Estado do Pará elaborou o tucupi preto que, através de uma preparação do tucupi normalmente conhecido no Pará, conseguiu fazer uma elaboração do mesmo para servir como molho para saladas e comidas, podendo substituindo, dessa forma, outros tipos de molhos que contém um número maior de conservantes e aditivos, já que o molho de tucupi preto é feito apenas de água, tucupi e sódio.

O processo de fabricação do tucupi varia de produtor para produtor, bem como a variedade da mandioca utilizada no processo de extração da manipueira. O tratamento térmico aplicado para a eliminação dos compostos cianogênicos no tucupi, degrada os carotenóides existentes, já que estes são susceptíveis a ação da luz e do calor (RIBEIRO; BARRETO; COELHO, 2011).

Informações contidas em literatura sobre tucupi, principalmente, sobre tucupi preto são escassas, sendo assim necessário que faça uma caracterização físico-química completa deste produto, principalmente em relação ao teor de sódio, para poder fazer relação dele com o *shoyu*. O molho de soja ou molho *shoyu* é originário da China e obtido a partir do processamento do grão de soja, é um molho fermentado e muito utilizado na gastronomia como tempero (GOMES et al., 2017).

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi caracterizar físico-quimicamente e microbiologicamente o molho de tucupi preto e o molho *shoyu*, observando diferenças e semelhanças entre ambos, visto que têm utilização comercial parecidas.

2 | MÉTODOS

2.1 Matéria prima

As amostras de molho de tucupi preto e molho shoyu foram obtidas no supermercado de Belém no 6º bimestre de 2018. As análises foram realizadas no Laboratório de Química, Microbiologia e de Alimentos da Universidade do Estado do Pará (UEPA) – Campus V – Centro de Ciências Naturais e Tecnologia (CCNT), Belém– PA.

2.2 Análises microbiológicas

Foram levadas as amostras para o laboratório de microbiologia e realizadas as análises em triplicata de Coliformes Totais e Termotolerantes, Bacillus cereus, *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus*. **As metodologias de análise adotadas seguiram o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods,* da American Public Health Association (APHA 2001).**

2.3 Análises físico-químicas

Em triplicata, utilizando-se as metodologias do Instituto Adolfo Lutz (2008) quanto aos parâmetros: sólidos solúveis por refratometria com o auxílio de um Refractometer (017/IV), pH por leitura direta em pHmetro (017/IV), umidade (012/IV), cinzas (018/IV), proteína (037/IV), Sódio – Método de Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OSE), Glicídios redutores e não redutores – pelo método titulométrico de Lane-Eynon de acordo com Brasil (2013), Acidez total titulável – por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) devidamente padronizado, de acordo com Adolf Lutz (2008).

3 | RESULTADOS

Os resultados da caracterização físico-química da amostra de Tucupi e *Shoyu* expostos na Tabela 1.

Análises	Tucupi Preto	Molho Shoyu
pH	4,15	4,54
Acidez	0,38*	0,26*
Umidade (%)	90,75	72,47
Sódio (mg/100g)	22	692,0
Glicídios redutores (%)	0,94	3,48
Glicídios não redutores	0,69	1,52
Sólidos solúveis (BRIXº)	10	29
Proteínas (%)	2,04	1,94

*Acidez expressa em g de ácido cianídrico/100g para o tucupi preto e g de ácido lático/100g para o molho *shoyu*.

Tabela 1. Caracterização físico-química da amostra de Tucupi e *Shoyu*.

Análises microbiológicas

Análises	Resultados
Salmonella spp.	Ausência em 25g
Bacillus cereus	<10^2 UFC/g
Coliformes totais	<3 NMP/25g
Coliformes termotolerantes	<3 NMP/25g
Staphylococcus Aureus	Neg.

NMP: Número mais provável. Neg: Negativo

Tabela 2. Análises microbiológicas efetuadas nos molhos.

4 I DISCUSSÃO

A medida do pH é um parâmetro importante para a determinação de uma possível e rápida deterioração do produto, devido à presença e ao crescimento de microrganismos nocivos à saúde. Nos valores obtidos para o tucupi, há possibilidades do crescimento de bolores e leveduras. Para molho de tucupi comum são encontrados valores como pH, variando entre 3,00 e 4,35, classificando-se como um alimento de alta acidez. Já no presente estudo do tucupi preto e molho shoyu obteve-se 4, 15 para o tucupi preto e 4, 54 para o shoyu, o que os classifica também como alimentos ácidos podendo ocasionar possíveis deteriorações nos produtos se não forem armazenados e produzidos de forma correta.

Algumas análises foram comparadas em relação ao tucupi comum segundo as amostras de CHISTÉ et al, 2007. A acidez total das amostras analisadas variou entre 3,92 e 10,66 meq NaOH.100 mL–1. No caso do tucupi preto apresentou uma acidez mais elevada e o molho shoyu uma acidez reduzida. A umidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição e pode afetar tanto seu processamento, quanto sua embalagem e estocagem. Sendo o tucupi um alimento líquido, sua umidade se apresentou na faixa de 94,64 a 97,46% e quando comparado aos molhos do estudo o tucupi amarelo tem maior umidade.

No que se refere ao sódio, é possível observar que para os dois molhos analisados o molho *shoyu* apresentou 692,0 mg/100g, estando assim, dentro do valor referência de tolerância de ± 20% de acordo com a Resolução ANVISA RDC nº 360 de 23/12/2003, retificada em 12/06/2013 pelo DOU nº 111, seção 1, pg. 37 em relação ao valor declarado no rótulo sendo de 818 mg de sódio/1 colher de sopa. O tucupi preto apresentou também, um resultado positívo do valor contido em sua informação nutricional que é de 154 mg de sódio/1 colher de sopa. Assim, verifica-se que não ocorreu divergências, porém deve ser mais pesquisada, em estudos futuros para confirmação desses resultados.

O valor de glicídios redutores e não redutores do tucupi preto foram menores que os do molho *shoyu*, assim como o valor de sólidos solúveis medidos em ºBRIX.

Com relação ao teor de proteínas, o tucupi normal apresentou valores baixos, entre 0,33 e 0,66%. Já o molho de tucupi preto e molho shoyu possuem valores de proteínas superiores.

O tucupi deve seguir os limites máximos microbiológicos inalterados de salmonella spp sendo ausente, segundo Boletim IOB, Manual de procedimentos (2008), Bacillus cereus: deve ser < 10^2 UFC/g, não ultrapassando os valores indicados. Na tabela 2, os resultados de microbiológicos serão comparados com o ADEPARÁ (2008), a qual estabelece no Padrão de Identidade e Qualidade do Tucupi, os limites máximos microbiológicos para coliformes de <3 NMP. Pode-se perceber que os molhos se encontram de acordo com a legislação. Os índices de coliformes totais e termotolerantes são utilizados como indicadores das condições higiênico-sanitárias do processamento.

5 | CONCLUSÃO

A partir do exposto é possível concluir que o molho de tucupi preto e o molho *shoyu* tiveram grande diferença nas análises físico-químicas, ressaltando o menor teor de sódio do tucupi, onde de se teve a maior discrepância quando comparados os molhos, porém com resultados de análises microbiológicas parecidos. Sendo importante pontuar que o molho de tucupi preto ainda não possui uma característica físico química e microbiológico padrão, visto que é um produto novo no mercado.

REFERÊNCIAS

1-Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará - ADEPARÁ. (2008). Padrão de Identidade e Qualidade do Tucupi. Belém: Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará. Disponível em: <http://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-1-2008-pa_147065.html.>. Acesso em 29 mai 2019.

2-AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**: edited Ig W. Horwitz 16ª ed. Washington, 850 p, v. 2, 1997.

3-BRASIL ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 12, de 02 de janeiro 2002.** Disponível em:< www.anvisa.gov.br/legis>. Acesso em 23 dez. 2018.

4-BRASIL. Resolução ANVISA RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003, retificada em 12 de junho de 2013 pelo DOU nº 111, seção 1, pg. 37.

5-BRASIL. Resolução ANVISA RDC nº 360 de 23/12/2003, retificada em 12/06/2013 pelo DOU nº 111, seção 1, pg. 37.

6-BRASIL. Resolução RDC n° 175, de 08 de julho de 2003, ANVISA, aprova o regulamento técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília DF (2003). Disponível em: <http://ww.anvisa.gov.br>. Acesso em 10 de jan. 2019.BRASIL, Zelita de O. Lopes. **Determinação de açúcares por titulometria.** 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/MAPA.

7-CASSONI, V. **Valorização de resíduo de processamento de farinha de mandioca (manipueira) por acetificação.** 2008. 76 f. Dissertação (Mestre em agronomia - Energia na agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2008.

8-CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; OLIVEIRA, S. S. **Estudo das propriedades físico-químicas do tucupi.** 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n3/a02v27n3>. Acesso em 23 dez 2019.

9- Cohen, K. O., Oliveira, S. S., & Chisté, R. C. (2007). Quantificação de Teores de Compostos Cianogênicos Totais em Produtos Elaborados com Raízes de Mandioca. Belém: Embrapa Amazônia Oriental Documentos, 290.

10-MACENA, DANIEL A.; et al. **Avaliação da disponibilidade de sódio em molho de soja utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica.** Colloquium Exactarum. ISSN: 2178-8332, v. 9, n. 3, p. 13-20, 27 mar. 2018. Disponível em: <http://journal.unoeste.br/index.php/ce/article/view/2228>. Acesso em 11 dez. 2018.

11-RIBEIRO, D., B. BARRETO, W. D. COELHO, Z. A. M. **Technological Aspects of β-Carotene Production. FoodBioprocessTechnol**, 2011.

12-SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema SimPlate.** São Paulo. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2012. Disponível em: < http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-29102002-161542/pt-br.php>. Acesso em 9 jan. 2019.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE BIOETANOL E CONTROLE MICROBIOLÓGICO DO PROCESSO

Data de aceite: 19/01/2021
Data de submissão: 08/01/2020

Arlindo José Lima de Carvalho
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP FCFAR - Campus de Araraquara
Araraquara – SP
CV: http://lattes.cnpq.br/9485983744882630

Mariana Carina Frigieri
Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani – Fatec Jaboticabal
Jaboticabal – SP
CV: http://lattes.cnpq.br/4287525933081582

Leonardo Lucas Madaleno
Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani – Fatec Jaboticabal
Jaboticabal – SP
CV: http://lattes.cnpq.br/3972203417794213

Wilton Rogério Lustri
Universidade de Araraquara – UNIARA
Araraquara – SP
CV: http://lattes.cnpq.br/8058174156603507

Silmara Cristina Lazarini Frajácomo
Universidade de Araraquara – UNIARA
Araraquara – SP
CV: http://lattes.cnpq.br/7987248199205915

Danilo Luiz Flumignan
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso - IFMT - Campus Cuiabá
Cuiabá – MT
CV: http://lattes.cnpq.br/3524264298241361

Ariela Veloso de Paula
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP FCFAR - Campus de Araraquara
Araraquara – SP
CV: http://lattes.cnpq.br/5169005740180194

Cássia Regina Primila Cardoso
Universidade Federal de Mato Grosso
Sinop – MT
CV: http://lattes.cnpq.br/6759984980265462

RESUMO: Durante o processo de fermentação industrial tradicional, ocorre a produção de bioetanol pela levedura a partir de um mosto açucarado, onde vários tipos de contaminações podem ocorrer prejudicando a obtenção do produto, dentre essas, a contaminação microbiana. O controle microbiológico do processo requer um tratamento diferencial, onde é necessário controlar os contaminantes, sem, no entanto, afetar a ação das leveduras selecionadas. Atualmente, estão sendo estudadas formas naturais de controle que atendem aos requisitos de produção sem afetar adversamente o meio ambiente ou impedir o comércio subsequente dos subprodutos gerados. Diante dessa realidade, o presente trabalho buscou discutir esse tema importante, abordando dados atuais da produção de bioetanol, perspectivas do setor e do controle microbiológico do processo, destacando as formas naturais de controle, dentre elas, o uso de extratos vegetais.

PALAVRAS-CHAVE: Extrato vegetal. Antimicrobiano. Contaminantes. Fermentação.

BIOETHANOL PRODUCTION AND MICROBIOLOGICAL PROCESS CONTROL

ABSTRACT: During the traditional industrial fermentation process, yeast bioethanol is produced from a must with sugar, where various types of contamination can occur, reducing the production of the product, among which, microbial contamination. The microbiological control of the process requires a differential treatment, where it is necessary to control the contaminants, without, however, affect the action of the selected yeasts. Currently, natural forms of control that meet production requirements are being studied without adversely affecting the environment or preventing subsequent trade in the generated by-products. In view of this reality, the present study aims to discuss this important topic, addressing current data on bioethanol production, sector perspectives, and the microbiological control of the process, highlighting the natural forms of control, including the use of plant extracts.
KEYWORDS: Vegetable extract. Antimicrobial. Contaminants. Fermentation.

1 I INTRODUÇÃO

O processo fermentativo é a principal via de obtenção do etanol através da oxidação dos monômeros de açúcar pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (NIELSEN *et al*., 2013; AZHAR *et al*., 2017). Para que este processo se realize é preparado o mosto, o qual pode ser procedente do caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço gerando um ambiente com teor de açúcar e pH ajustados para favorecer o processo fermentativo e inibir o processo respiratório nas leveduras (DELLA-BIANCA *et al*., 2013). Porém, essas mesmas condições também facilitam o desenvolvimento de uma série de micro-organismos contaminantes como bactérias e leveduras selvagens (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011; BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011), os quais são facilmente assimilados durante todo o processo, desde a colheita, armazenamento e processamento da matéria-prima (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011), até pela água de diluição do mosto e pelos equipamentos e tubulações do próprio processo (OLIVEIRA *et al*., 2013; BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

A presença de micro-organismos contaminantes resulta em queda no rendimento fermentativo e o controle torna-se de fundamental importância para o setor produtivo (NAVES *et al*., 2010). O controle bacteriano no processo é feito pela adição de ácido sulfúrico, porém para altos níveis de contaminação é realizada a utilização de antibióticos (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011), no entanto esse uso inviabiliza o comércio posterior da levedura seca para alimentação animal e outros fins, por deixarem resíduos nas células (FREITAS; ROMANO, 2013).

Além disso, o gasto com antibióticos torna-se um dos grandes desafios do processo (BREXÓ; SANT'ANA, 2017) e a busca por formas alternativas de controle passa a despertar muito interesse (CAETANO; MADALENO, 2011; MADALENO *et al*., 2016; RICH *et al*., 2018).

Os produtos naturais derivados de vegetais possuem grande potencial ao desenvolvimento de produtos de interesse por serem, atualmente, a principal fonte de

novas moléculas químicas bioativas (ANAND, et al, 2020).

2 I PRODUTIVIDADE E PERSPECTIVA DO SETOR SUCROENERGÉTICO

No mundo moderno a necessidade do deslocamento da produção e das pessoas faz com que os combustíveis sejam intensamente utilizados, porém o uso de combustíveis fósseis tem sido questionado devido à sua finitude e efeitos adversos causados ao ambiente, como aumento dos gases de efeito estufa gerando aquecimento global, mudanças climáticas com possíveis alterações do nível do mar, da biodiversidade, aumento da poluição urbana entre outros (ZABED *et al.*, 2017). Neste sentido, há uma crescente demanda pelo uso de combustíveis alternativos que proporcionem segurança energética e ambiental, impulsionando os estudos recentes devido a serem oriundos de fontes renováveis ou até mesmo de resíduos gerados pela ação humana, degradação natural de frutas e outros vegetais ou da produção industrial (BHATIA; JOHRI; AHMAD, 2012; SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016).

Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, no Brasil 45% da energia e 18% dos combustíveis provêm de fontes renováveis, enquanto que, no restante do mundo 86% da energia é obtida de fontes não renováveis (ANP, 2020a).

Dentre as alternativas energéticas para a diminuição da dependência de combustíveis fósseis surge o bioetanol, o qual pode ser obtido a partir de diversas fontes que contenham quantidade apreciável de carboidratos (ZABED *et al.*, 2017). O Brasil foi pioneiro nesta aplicação (ANP, 2020a), porém devido à facilidade de obtenção e ao baixo custo de produção, a utilização dessa alternativa energética tem aumentado em nível global (RFA, 2020), tanto para uso direto como combustível ou adicionado à gasolina (SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016).

O bioetanol produzido no Brasil, destina-se principalmente ao mercado interno e à exportação para os países da União Européia, Estados Unidos e China (VIDAL, 2019). Atualmente a obtenção deste biocombustível é realizada através de fontes primárias contendo açúcares simples (biomassa açucarada) e amido (biomassa amilácea), gerando o bioetanol referido como de primeira geração e também de fontes de biomassa lignocelulósica e algas, gerando, o bioetanol referido como de segunda e terceira geração, respectivamente (ZABED *et al.*, 2017).

Na Tabela 1 é possível verificar a produção mundial de bioetanol combustível (RFA, 2020). O Estados Unidos é o maior produtor mundial de bioetanol, responsável por 54% do total produzido, sendo que sua maior produção é de bioetanol de primeira geração através do uso do milho (biomassa amilácea) como matéria-prima. O Brasil é o segundo maior produtor em nível mundial, responsável por 30% do total, sendo que a maior produção nacional também é de bioetanol de primeira geração, porém utilizando fontes açucaradas como o caldo de cana-de-açúcar ou o melaço (resíduo da produção de açúcar) para

obtenção do mosto, onde os açúcares fermentescíveis que serão convertidos em bioetanol, estão prontamente disponíveis para o processo fermentativo (SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016).

País	2015	2016	2017	2018	2019	% da produção mundial
Estados Unidos	56.051	58.345	60.324	60.911	59.719	54%
Brasil	27.255	25.589	25.287	30.321	32.441	30%
União Européia	5.250	5.213	5.300	5.413	5.451	5%
China	3.078	3.199	3.255	3.975	3.407	3%
Canadá	1.650	1.650	1.779	1.817	1.893	2%
India	738	1.041	795	1.514	2.006	2%
Tailandia	1.264	1.219	1.401	1.476	1.590	1%
Argentina	799	999	1.098	1.098	1.098	1%
Outros países	1.480	1.855	1.567	2.078	2.271	2%
Total	97.565	99.110	100.806	108.603	109.875	

Tabela 1. Produção anual mundial de bioetanol combustível (Mil.m^3)

Fonte: RFA, (2020). Tabela adaptada.

A utilização da cana-de-açúcar para obtenção da matéria-prima a ser fermentada é atrativa, uma vez que proporcionam um alto rendimento de açúcar e durante a sua utilização industrial acaba gerando outros subprodutos de interesse para a manutenção da própria produção industrial ou mesmo para transações comerciais, como no caso da palha e do bagaço, os quais podem ser utilizados na caldeira para gerar a energia que manterá o processo industrial ativo ou poderá ser utilizado como uma fonte de biomassa para obtenção de etanol de segunda geração; da vinhaça, a qual pode ser utilizada para fertirrigação e para a obtenção de biogás e da torta de filtro que pode ser utilizada na adubação agrícola. A cadeia produtiva de etanol a partir da cana-de-açúcar gera como perspectiva a transformação das unidades industriais em biofábricas, com a produção integrada de vários produtos de interesse comercial.

Neste cenário mundial também aparece a mandioca e batata doce (biomassa amiláceas) como potenciais matérias-primas para produção de bioetanol, as quais não necessitam de grande fertilidade do solo para o seu cultivo e o uso da biomassa lignocelulósica resultante de culturas energéticas, plantas aquáticas, materiais florestais, resíduos agrícolas, urbanos e industriais entre outros, os quais são abundante em todo o mundo e permitem, na grande maioria, a obtenção de etanol sem a necessidade da utilização novas de áreas de plantio e sem interferir na produção de alimentos e forragens

(ZABED *et al.*, 2017). O potencial do uso do sorgo sacaríneo como fonte de biomassa açucarada também tem sido avaliado (MASSON, *et al.*, 2015)

O uso do bioetanol é um dos mais promissores devido a introdução de motorização híbrida no mercado, onde o motor a combustão usa a tecnologia flex fuel, que utilizam mistura de 0% a 100% de etanol e gasolina (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

A demanda por esse biocombustível atualmente também é impulsionada pelo desenvolvimento de políticas governamentais em diversos países visando o estímulo da produção e utilização de fontes renováveis de energia (VIDAL, 2019). A União Européia através da diretiva 2009/28/CE, a qual trata da promoção da utilização de energia de fontes renováveis conhecida como RED I, estabeleceu metas para a produção e utilização de energias renováveis em 2020, posteriormente com a Diretiva (UE) 2018/2001 (RED II), foi estabelecido pelo menos, 32 % de energia renovável no consumo final bruto de energia até 2030 (EUROPEIA, 2019). Nos Estados Unidos, segundo a Low Carbon Fuel Standart (LCFS) a meta é de reduzir as emissões dos gases de efeito estufa em 20% até 2030 e segundo Renewable Fuel Standard (RFS) a perspectiva seria a produção de um volume de 36 bilhões de galões (cerca de 136 bilhões de litros) de combustíveis renováveis em 2022 (ROITMAN, 2019).

No Brasil, no final do ano de 2017 foi criada, através da Lei 13.576, a Política Nacional de Biocombustíveis, conhecida como RenovaBio, a qual visa, entre outros objetivos, estimular a redução das emissões de gases de efeito estufa através do incremento no uso de biocombustíves na matriz energética nacional (BRASIL, 2017).

A produção de etanol variava mais em função dos preços do açúcar no mercado externo do que em relação a produção de cana-de-açúcar, pois o setor possuía uma flexibilidade para a produção de açúcar ou etanol, que pode variar de 50% para qualquer um dos produtos ou até para 65% de produção de etanol e 35% de açúcar conforme ilustra o gráfico da Figura 1.
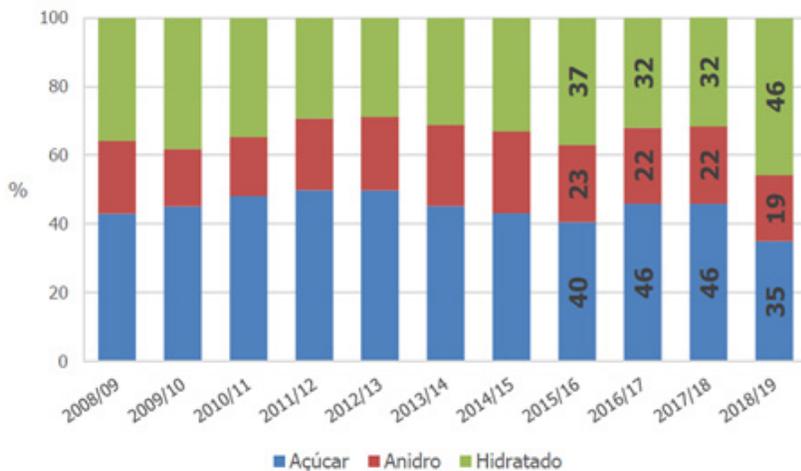
Figura 1. Mix de produção de açúcar e etanol – Safra 2008/09 até 2018/19

Fonte: EPE, 2019

A adoção desta nova política visa o desenvolvimento de mecanismos que garantam a previsibilidade na produção necessária para atrair investimentos, de forma a conectar sustentabilidade ambiental, social e econômica. Através desta Lei foram estabelecidas metas a serem alcançadas até 2030 e também a criação do CBIO (Crédito de Descarbonização), os quais são títulos financeiros que deverão ser adquiridos pelos distribuidores de combustíveis para compensar suas emissões e cumprir as metas de descarbonização estipuladas anualmente. Investidores também podem adquiri-los e a expectativa é que se torne uma commodity mundial (GRASSI; PEREIRA, 2019). Assim, esse programa visa retomar os incentivos para o aumento da produtividade nacional, uma vez que propõe uma certa segurança econômica para os produtores.

Na Figura 2 é possível acompanhar a evolução mensal da produção nacional anual de bioetanol e observar que há um incremento na produção brasileira nos meses de abril à novembro, correspondentes aos meses de colheita da cultura da cana-de-açúcar. Considerando o mês de abril, no ano corrente teve a maior produção dos últimos nove anos.
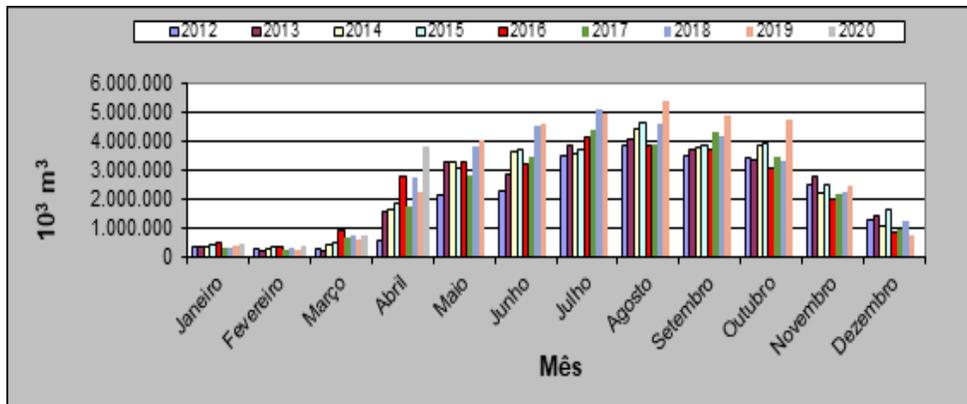
Figura 2. Evolução mensal da produção anual brasileira de bioetanol

Fonte: ANP, 2020b.

A Tabela 2 mostra os dados de moagem de cana-de-açúcar e a Tabela 3 os dados da produção de bioetanol durante o ano separado por safra (abril a março) e por região produtora. É possível verificar o predomínio da produção nacional na Região Centro-Sul do país, a qual na safra anterior foi responsável pela obtenção de 93,4% do total produzido.

Moagem de Cana-de-Açúcar Safras – 2015/2016 até 2019/2020 (Mil toneladas)					
Safra	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019	2019/2020
Região Centro-Sul	617.709	607.137	596.260	573.125	590.361
Região Norte-Nordeste	49.115	44.704	44.806	47.707	52.316
Brasil	666.824	651.841	641.066	620.832	642.677

Tabela 2. Moagem de Cana-de-Açúcar no Brasil nas Últimas Cinco Safras

Fonte: UNICA, (2020). Tabela adaptada

Etanol Total – 2015/2016 até 2019/2020 (Mil m³)					
Safra	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019	2019/2020
Região Centro-Sul	28.225	25.651	26.088	30.953	33.258
Região Norte-Nordeste	2.008	1.603	1.771	2.150	2.337
Brasil	30.232	27.254	27.859	33.103	35.595

Tabela 3. Produção de biotanol no Brasil por safra

Fonte: UNICA, (2020). Tabela adaptada

Além da produção relatada, o país tem adotado outras formas de obtenção do bioetanol na tentativa de aumentar essa produção e corresponder às expectativas do

RenovaBio, como a obtenção de etanol a partir do milho e o desenvolvimento e consolidação das tecnologias de segunda geração, que permitirão o aumento da produtividade, sem aumentar a área destinada ao plantio, por meio de culturas de cana-de-açúcar especializadas em energia, como a Cana Energia e resíduos agrícolas (GRASSI; PEREIRA, 2019).

A região Centro-Oeste brasileira, produtora de grãos, tem apresentado um crescente aumento produção de etanol devido à disponibilidade da matéria-prima e a possibilidade de aproveitamento do complexo produtor de etanol a partir da cana-de-açúcar também na entressafra para produção a partir do milho (VIDAL, 2019). A produção de etanol a partir do milho no Brasil é destacada como um importante propulsor do desenvolvimento energético, econômico, social e ambiental na produção, minimizando perdas em logística e exportação de grãos (ECKERT, *et al.*, 2018). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a estimativa nacional de plantio do milho, na temporada 2019/20, deve apresentar uma produção recorde de 101 milhões de toneladas (CONAB, 2020a), sendo a região Centro-Oeste responsável por cerca de 95% da produção de etanol a base de milho, considerando a estimativa de produção para a safra 2020/21 de 2,7 bilhões de litros no país, dos quais 2,56 bilhões nessa região, distribuídos entre Mato Grosso e Goiás (CONAB, 2020b).

O aumento da produção de bioetanol impulsionado pelas políticas públicas contribui para a transição energética na qual o mundo deve se ajustar e em especial no Brasil, já fez parte, junto com a energia advinda de outras fontes renováveis, 45% da matriz energética brasileira em 2018 (EPE, 2019).

A Tabela 4 apresenta uma perspectiva da fonte de energia a ser utilizada no Brasil e no mundo no ano de 2025. É possível verificar o destaque do Brasil em relação ao cenário mundial no que diz respeito ao uso de energias renováveis.

Fonte de Energia	Brasil
Energia Não Renovável	51,2%
Derivados da Cana-de-açúcar	20,2%
Hidráulica e Eletricidade	13,6%
Lenha e Carvão Vegetal	7,4%
Outras Renováveis	5,0%
Eólica	2,2%
Solar	0,5%
Total	333,8 M_{TEP}

Fonte de Energia	Mundial
Energia Não Renovável	82,7%
Bioenergia Moderna	6,9%
Hidráulica	3,0%
Biomassa Sólida	2,8%
Outras Renováveis	4,6%
Total	14,1 G_{TEP}

Tabela 4. Perspectiva de oferta interna de Energia – Brasil e Mundial no ano de 2025

Fonte: EPE, 2019. Tabela adaptada

Com base na tabela acima, foi possível calcular a participação dos derivados da cana-de-açúcar em MTEP (Milhões de toneladas de petróleo equivalente) com o incremento projetado para 2025 de 57,4% conforme apresentado na Tabela 5.

Incremento na Substituição de MTEP por Derivados da Cana-de-açúcar			
Ano	Total MTEP	Derivados da Cana-de-açúcar	Substituição de MTEP
2008	252,0	17,0%	42,8
2018	288,0	17,4%	50,1
2025	333,8	20,2%	67,4
Incremento na substituição de MTEP de 2008 a 2025			**57,4%**

Tabela 5. Substituição de MTEP por Derivados da Cana-de-açúcar.

Fonte: Elaborado por Arlindo José Lima de Carvalho

O Brasil ocupa um espaço considerável no perfil energético mundial, principalmente pelo caráter renovável da sua matriz, advindo de seu potencial, e, em especial, das políticas públicas que incentivam a segurança energética nacional com o uso dos recursos renováveis. Assim, a matriz energética brasileira acaba sendo modelo e incentivo para muitos países na adoção de energias renováveis, como o bioetanol.

3 I PROCESSO FERMENTATIVO

Através do processo fermentativo tradicional é que ocorre a obtenção da maior parte (90-95%) do bioetanol mundial (SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016), por ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual metaboliza os açúcares (hexoses) solúveis disponíveis, gerando neste processo, além do bioetanol, dióxido de carbono.

A levedura *S. cerevisiae* é um fungo unicelular (ascomiceto) anaeróbico facultativo, podendo obter energia para sua sobrevivência através da respiração aeróbica ou através da fermentação. Na respiração aeróbica ocorre a produção de 18 a 19 vezes mais energia biologicamente utilizável disponível para a levedura do que na fermentação, sendo assim, a respiração um processo mais benéfico, em termos energéticos, do que a fermentação para a levedura (SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016).

Baixas concentrações de glicose favorecem o processo respiratório e a produção de biomassa, sendo essas condições utilizadas para a produção industrial de leveduras secas selecionadas. No entanto, mesmo na presença de oxigênio, se a concentração de açúcar for maior que um valor crítico (por exemplo, 9 $g.L^{-1}$) a respiração torna-se impossível e apenas ocorre a metabolização dos açúcares pela via fermentativa (PRONK; YDE STEENSMA; VAN DIJKEN, 1996).

A hexose assimilada pela célula sofre o processo de glicólise gerando duas moléculas de piruvato, duas moléculas de ATP e duas moléculas da coenzima reduzida NADH. Na respiração, a molécula de piruvato é direcionada para o ciclo de Krebs, onde será totalmente oxidada. Na fermentação etanólica, o piruvato é convertido, em acetaldeído, o qual sofre rearranjo molecular para formar a molécula de etanol, com utilização de NADH (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016). A molécula de etanol pode ser utilizada como fonte de energia, pois ainda concentra a maior parte da energia da molécula de glicose que não foi totalmente oxidada neste processo. A Figura 3 apresenta um esquema do processo de fermentação etanólica.
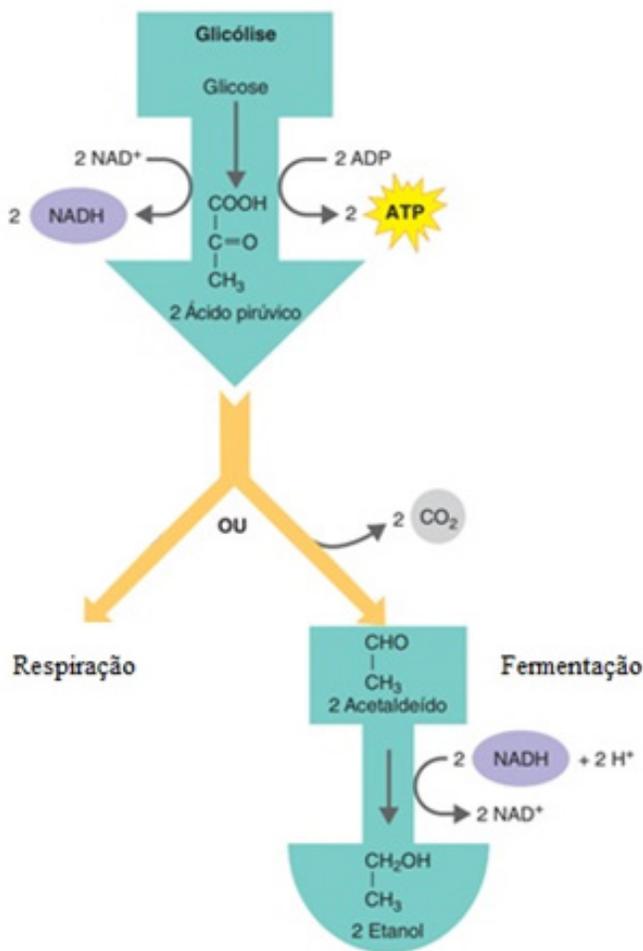
Figura 3. Processo bioquímico de fermentação etanólica

Fonte: TORTORA; CASE; FUNKE, 2016. Figura adaptada.

Durante a fermentação pode haver também a síntese de produtos secundários, como glicerol, succinato, álcoois superiores, ácidos orgânicos e outros, os quais estão relacionados com a adaptação e sobrevivência da levedura (BREXÓ; SANT'ANA, 2017). A levedura é um organismo resistente, mas sob stress, a cada 1ºC de aumento na temperatura acima de 35ºC o processo metabólico pode não funcionar adequadamente (NARENDRANATH, 2003).

4 | PARÂMETROS TECNOLÓGICOS DO PROCESSO FERMENTATIVO

Nas usinas brasileiras o processo fermentativo chega a ter rendimentos teóricos de 92-93% enquanto os outros 7 a 8% são direcionados para o metabolismo celular. O processo ocorre em grandes tanques industriais (0,5 a 3 milhões de litros) e com altas densidades de células de levedura (10–15% p/v) e com o uso do mosto a partir do caldo de cana-de-açúcar ou do melaço (resíduo da produção de açúcar) diluído em água ou uma mistura de ambos (AMORIM *et al*., 2011). A produtividade do processo está relacionada a quantidade de açúcares disponíveis para serem fermentados, ou seja, açúcares fermentescíveis, presentes no mosto (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

Geralmente, o processo ocorre em um período de 6 a 12 horas a aproximadamente 30°C, sendo que ao final do processo a concentração de bioetanol atinge 7-11% (v/v), com menos de 0,1% de açúcar restantes sem fermentar. O vinho levedurado é centrifugado para separação de leveduras e do vinho, o qual é direcionado para o processo de destilação, gerando ao final o bioetanol e a vinhaça. As leveduras concentradas (creme de levedura) recebem um tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,0-2,5), e quando necessário também antibióticos, que visam reduzir a contaminação bacteriana. Após 2 a 3 horas, as leveduras retornam aos tanques de fermentação para iniciar um novo ciclo. Durante todo o processo são realizadas análises para acompanhamento da contaminação bacteriana e também da viabilidade da levedura. O processo de reutilização da levedura ocorre durante toda a produção industrial, no período da safra e representa uma vantagem para a indústria, pois economiza açúcar e aumenta o rendimento da fermentação (AMORIM *et al*., 2011, BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

Um esquema do processo industrial brasileiro de obtenção de bioetanol acoplado à produção de açúcar pode ser verificado na Figura 4.
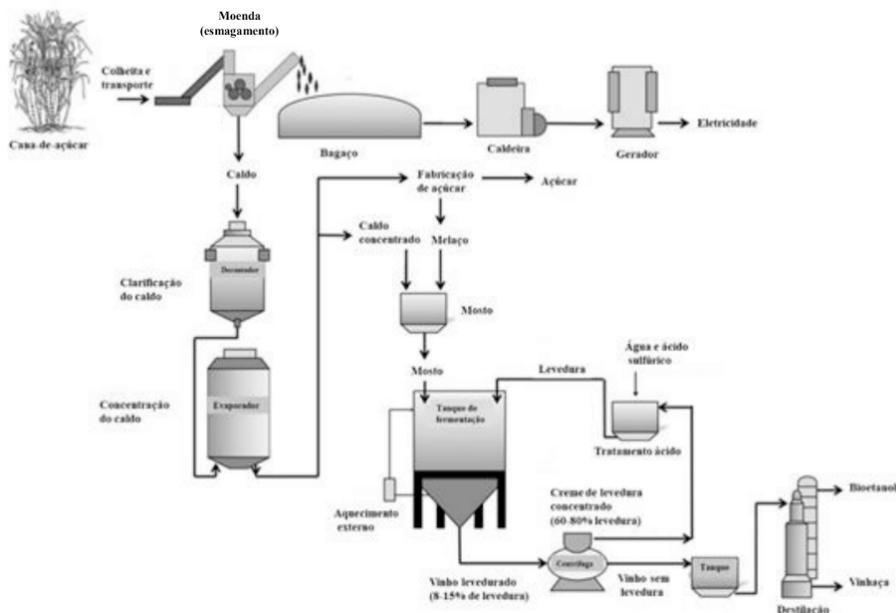
Figura 4. Esquema da produção brasileira de bioetanol

Fonte: AMORIM *et al*., (2011). Figura adaptada.

Para que o processo seja atrativo industrialmente e executável economicamente deve apresentar expressiva taxa de fermentação e consequentemente, alto rendimento e custo de produção por hectare relativamente baixo (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

5 I CONTROLE MICROBIOLÓGICO DURANTE A PRODUÇÃO DE ETANOL

Durante a fermentação industrial pode ocorrer a contaminação do processo com bactérias e leveduras selvagens. Dentre os contaminantes bacterianos comumente são encontradas espécies Gram-positivas, como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Bacillus* (LUCENA *et al*., 2010; BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011; BREXÓ; SANT'ANA, 2017), as quais podem adentrar o processo em todas as etapas (MADALENO *et al*., 2019).

A contaminação microbiana é um fator limitante para o processo, pois resulta em queda de 2 a 22% de perda na produção (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011), porém em casos extremos, a redução no rendimento do processo pode chegar de 20 a 30% (BREXÓ; SANT'ANA, 2017). Concentração bacteriana acima de 10^7UFC/mL, frequentemente alteram a cinética do processo resultando em perdas de aproximadamente 20.000L de bioetanol por dia (SEKOAI; MHLONGO; EZEOKOLI, 2019) e acima de 10^8UFC/mL, a perda pode chegar a 30.000L de bioetanol por dia em uma destilaria capaz de produzir um milhão de litros por dia (CECCATOANTONINI, 2018). Essa redução ocorre principalmente devido à competição

pelo açúcar, floculação do fermento, formação de goma, inibição e morte das leveduras (RAVANELI *et al*., 2011), além de poderem favorecer o processo respiratório da levedura, o acúmulo de glicerol (DONG; LIN; LI, 2015) e a formação de biofilmes recalcitrantes (RICH *et al*., 2015).

O crescimento bacteriano acaba gerando custos adicionais no processo de produção com a utilização de produtos químicos para controlar os efeitos da contaminação, como antiespumantes, antibióticos, entre outros (NAGHSHBANDI *et al*., 2019). No controle industrial da proliferação bacteriana é realizado o tratamento com ácido sulfúrico e para altos níveis de contaminação é feita a utilização de antibióticos que causam a morte ou inibem micro-organismos específicos de maneira seletiva (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011; FREITAS; ROMANO, 2013).

Muitos antibióticos, como a penicilina G, virginiamicina, monensina entre outros, são empregados frequentemente na redução da contaminação (LEITE *et al*., 2013; WALTER, *et al*., 2019). Entretanto, a utilização destes produtos resultam em resíduos nas leveduras descartadas do processo, as quais após a secagem não podem mais ser utilizadas como complemento na ração animal (FREITAS; ROMANO, 2013), dificultando o comércio deste subproduto, pois as leveduras secas, com resíduos de antibióticos devem ser incineradas. Outro problema enfrentado pelo uso de antibióticos é a seleção de bactérias resistentes (WALTER, *et al*., 2019), gerando questionamentos quanto ao uso contínuo destas substâncias.

Além disso, o gasto com antibióticos torna-se um dos grandes desafios do processo (BREXÓ; SANT'ANA, 2017), sendo o desenvolvimento de formas alternativas de controle uma necessidade do setor.

O crescimento do uso de antibióticos no mundo vem preocupando as agências de saúde mundial e local. O relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), avaliou o uso de antibióticos, apontando o Brasil como o décimo nono maior consumidor, dentre os em 65 países participantes da pesquisa (WHO, 2018). KLEIN, *et al.,* (2018), destacam um aumento 65% no consumo de antibióticos no mundo entre os anos 2000 e 2015, chegando a 34,8 bilhões de DDDs (Dose Diária Definida por 1000 habitantes) em 2015, sendo 70% o uso na agropecuária. No Brasil o consumo foi de 22,75 DDDs (WHO, 2018), neste período. Considerando o valor médio dos antibióticos mais consumidos no país, o preço atual ao consumidor de R$/DDD 4,12 equivalente a US$/DDD 1,04, podemos estimar (Tabela 6) os valores do consumo desse medicamento no Brasil e no Mundo, levando em conta os dados da população brasileira apontados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística como 210.286.630 de habitantes (IBGE, 2019) e os valores estimados para uso na agropecuária (Tabela 7). É possível estimar que o Brasil gasta 4,23 Bi US$/ano com antibióticos no setor agropecuário.

Estimativa do gasto anual com antibióticos no mundo – Consumo humano			
Ano	DDDs (Bilhão)	US$/DDD	Bi US$/ano
2015	34,8	1,04	36,19

Tabela 6. Cálculo do valor estimado com consumo de antibióticos no mundo

Fonte: Elaborado por Arlindo José Lima de Carvalho

Estimativa do gasto anual com antibióticos no Brasil em 2016 (Consumo humano e Agropecuário)			
Setor do Consumo	Valor (Bi R$/ano)	Valor (Bi US$/ano)	Participação
Humano	7,19	1,81	30%
Agropecuária	16,79	4,23	70%
Total	23,98	6,04	100%

Tabela 7. Cálculo do valor estimado com consumo de antibióticos no Brasil

Fonte: Elaborado por Arlindo José Lima de Carvalho

6 I CONTROLE MICROBIOLÓGICO NATURAL

A busca de formas alternativas de controle deve levar em consideração alguns aspectos primordiais como: não interferir na produção das leveduras, possuir amplo espectro de ação contra a maioria dos contaminantes, desenvolvimento mínimo de resistência, facilidade de administração, não ser tóxico para plantas, animais e seres humanos e possuir viabilidade econômica (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011).

Neste sentido, o uso de plantas tem se mostrado promissor, uma vez que os vegetais, além dos metabólitos primários, relacionados à manutenção da vida vegetal, também produzem diversos compostos relacionados à sua adaptação ao ambiente, autodefesa e interação com outros organismos, os metabólitos secundários (SALAM; QUAVE, 2018), dentre os quais, os alcalóides e polifenóis demonstraram eficácia antimicrobiana (ANAND, et al, 2020).

As plantas contribuem de forma significativa na obtenção de produtos com atividades terapêuticas de interesse sendo os extratos vegetais bioativos amplamente utilizados na saúde, agricultura, pecuária entre outras áreas (PETROVSKA, 2012; ABU-DARWISH E EFFERTH, 2018).

Diversos autores destacam a importância do uso de produtos naturais como uma fonte potencial de controle microbiano (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; MOLONEY, 2016). Vários derivados de plantas tem sido associados com propriedades antibacterianas (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011), e têm sido empregados extratos vegetais frente às bactérias de interesse (GONÇALVES *et al.*, 2005; SALES *et al.*, 2014; FURTADO *et al.*, 2015), sendo chamado por alguns autores de antimicrobianos de origem vegetal – PDAs,

plant-derived antimicrobials (UPADHYAY *et al.*, 2014).

Extratos vegetais apresentando ação contra bactérias Gram-positivas, em estudos clínicos ou mesmo na agricultura, pecuária ou indústria alimentícia podem ser uma fonte potencial para estudos de ação nos contaminantes bacterianos normalmente encontrados na produção do bioetanol (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011). Diversas especiarias utilizadas em alimentos tem sido relatadas com grande potencial para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (LIU et al 2017), sendo que algumas já estão em avaliação na produção de bioetanol (MADALENO *et al.*, 2016).

ANAND, *et al*, (2020), revisando trabalhos sobre a família *Apocynaceae*, destaca que os vegetais podem ter um papel fundamental no desenvolvimento de drogas antimicrobianas mais eficazes e menos tóxicas, que podem superar a resistência aos antibióticos comumente utilizados.

O estudo do uso de extratos naturais como alternativa na produção de bioetanol tem sido considerado promissor com ampla possibilidade de exploração (SALAM; QUAVE, 2018) e interesse quando considerado as questões como de saúde pública, aspectos ecológicos e econômicos, sendo mais viável economicamente para uso industrial quanto menos nível de pureza for necessário, ou seja, quanto mais bruto for o extrato (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011).

Atualmente, o vegetal mais utilizado na indústria de bioetanol é o lúpulo (*Humulus lupulus*), do qual derivam os α-ácidos (humulonas) e β-ácidos (lupulonas), eficazes principalmente contra bactérias Gram-positivas e encontrados comercialmente com os nomes de IsoStab®, LactoStab® e Betabio 45® (CECCATOANTONINI, 2018).

Os derivados vegetais apresentam-se como uma fonte valiosa de compostos bioativos com atividades antimicrobiana, por estarem prontamente disponíveis, possuírem baixo custo de obtenção, quase não apresentarem efeitos colaterais, alguns deles mostrando-se eficazes na eliminação de bactérias resistentes à antibióticos e outros, embora não sejam eficaz por si só, apresentaram-se promissores quando combinados com antibióticos, sendo assim, ferramentas atraentes na pesquisa de produtos bioativos nos próximos anos (KHAMENEH, 2019).

Diante da grande extensão do Brasil (8,5 milhões km²), ocupando quase a metade da América do Sul, ocorre a incidência de várias zonas climáticas no país, possibilitando grandes variações ecológicas, formando zonas biogeográficas distintas ou biomas, que abrigam maior biodiversidade do planeta, possuindo mais de 20% do número total de espécies da Terra (MMA, 2020). O país possui uma vasta flora rica em espécies vegetais contendo vários compostos químicos com propriedades biológicas e potencial atividade terapêutica, como a presença de compostos fenólicos, provavelmente devido à própria condição ambiental de algumas de suas regiões (exposição ao estresse hídrico, alta radiação ultravioleta, ataques de herbívoros e infecções por fungos), os quais são precursores de compostos com atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas, sendo assim interessantes

alvos de bioprospecção (BAILÃO *et al.*, 2015)

Com a perspectiva do aumento da produção de etanol para cumprir as metas governamentais estabelecidas, o setor sucroenergético busca minimizar as contaminações microbianas utilizando antibióticos que geram preocupações ambientais e limitam o comércio da levedura seca por deixar resíduos. Neste sentido a utilização de extratos vegetais poderia ser uma forma alternativa e financeiramente atrativa de controle microbiológico do processo fermentativo.

7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de bioetanol tende a se desenvolver bastante devido a alterações na matriz energética mundial com a inserção dos biocombustíveis, sendo muito importante que o processo de fermentação ocorra adequadamente com minimização das perdas. Neste trabalho foi enfatizado a importância do controle microbiológico do processo, onde a otimização da produção pode ser alcançada pela inibição do processo respiratório nas leveduras e minimização dos contaminantes pelo uso de formas alternativas de controle como os extratos vegetais, que possam viabilizar a obtenção de antibacterianos naturais para uso no setor sucroenergético.

REFERÊNCIAS

ABU-DARWISH, M. S.; EFFERTH, T. **Medicinal plants from near east for cancer therapy.** Frontiers in pharmacology, v. 9, p. 56, 2018.

ANAND, U.; NANDY, S.; MUNDHRA, A.; DAS, N.; PANDEY, D. K.; DEY, A. **A review on antimicrobial botanicals, phytochemicals and natural resistance modifying agents from Apocynaceae family: Possible therapeutic approaches against multidrug resistance in pathogenic microorganisms.** Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, v. 51, p. 100695-100695, 2020.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J. V.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil**. Applied microbiology and biotechnology, v. 91, n. 5, p. 1267, 2011.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biocombustíveis.** Disponível em: http://www.anp.gov. br/biocombustiveis. Acesso em: 23 Jun. 2020a.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural **e Biocombustíveis. Biocombustíveis.** Disponível em: http://www.anp.gov. br/dados-estatisticos. Acesso em: 29 Jun. 2020b.

AZHAR, S. H. M.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; MARBAWI, H.; GANSAU, J. A.; FAIK, A. A. M.; RODRIGUES, K. F. **Yeasts in sustainable bioethanol production: A review.** Biochemistry and Biophysics Reports, v. 10, p. 52–61, 2017.

BAILÃO, E. F. L. C.; DEVILLA, I. A.; DA CONCEIÇÃO, E. C.; BORGES, L. L. **Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits.** International journal of molecular sciences, v. 16, n. 10, p. 23760-23783, 2015.

BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. **Microbial contamination of fuel ethanol fermentations.** Letters in Applied Microbiology, v. 53, n. 4, p. 387–394, 2011.

BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD, R. **An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review.** Amb Express, v. 2, n. 1, p. 1-19, 2012.

BRASIL, Casa Civil da Presidência da. **Lei no 13.576**, de 26 de dezembro de 2017. Institui a Política Nacional de Biocombustíveis (Renovabio).

BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. **Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 73, p. 423–434, 2017.

CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. **Controle de contaminantes na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais.** Ciência & Tecnologia FATEC-JB, v. 2, n. 1, p. 27–37, 2011.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 34, n. 6, p. 80, 2018.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 7, Safra 2019/20, n. 9, 2020a.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v. 7, Safra 2020/21, n. 1, 2020b.

DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. **What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry?** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, n. 3, p. 979–991, 2013.

DONG, S. J.; LIN, X. H.; LI, H. **Regulation of Lactobacillus plantarum contamination on the carbohydrate and energy related metabolisms of *Saccharomyces cerevisiae* during bioethanol fermentation**. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 68, p.33-41, 2015.

ECKERT, C. T.; FRIGO, E. P.; ALBRECHT, L. P.; ALBRECHT, A. J. P.; CHRIST, D.; SANTOS, W. G.; BERKEMBROCK, E.; EGEWARTH, V. A. **Maize ethanol production in Brazil: Characteristics and perspectives.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 82, p. 3907-3912, 2018.

EPE, Empresa de Pesquisa Energética, **Análise de conjuntura dos biocombustíveis ano 2018**, Anuário, 2019.

EUROPEIA, Comissão. Comunicação da comissão ao parlamento europeu, ao conselho, ao comité económico e social europeu e ao comité das regiões. **Relatório intercalar sobre as energias renováveis**, v. 225, 2019.

FREITAS, M. D.; ROMANO, F. P. **Tipos de contaminações bacterianas presentes no processo de fermentação alcoólica.** Bioenergia em Revista, v. 3, n. 2, p. 29–37, 2013.

FURTADO, J. M.; DA SILVA AMORIM, Á.; DE MACEDO FERNANDES, M. V.; OLIVEIRA, M. A. S. **Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de Eucalyptus globulus, Justicia pectoralis e Cymbopogon citratus frente a bactérias de interesse**. Journal of Health Sciences, v. 17, n. 4, 2015.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. **Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas.** Arquivos do Instituto Biológico, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GRASSI, M. C. B.; PEREIRA, G. A. G. **Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of Biofuels.** Industrial crops and products, v. 129, p. 201-205, 2019.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. **Natural products as antimicrobial agents.** Food control, v. 46, p. 412-429, 2014

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **População estimada**. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html?utm_source=portal&utm_medium=popclock&utm_campaign=novo_popclock. Acesso em: 07 Ago 2019.

KHAMENEH, B.; IRANSHAHY, M.; SOHEILI, V.; BAZZAZ, B. S. F. **Review on plant antimicrobials: A mechanistic viewpoint.** Antimicrobial Resistance & Infection Control, v. 8, n. 1, p. 118, 2019.

KLEIN, E. Y.; VAN BOECKEL, T. P.; MARTINEZ, E. M.; PANT, S.; GANDRA, S.; LEVIN, S. A.; GOOSSENS, H.; LAXMINARAYAN, R. **Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 115, n. 15, p. E3463-E3470, 2018.

LEITE, I. R.; FARIA, J. R.; MARQUEZ, L. D.; REIS, M. H.; DE RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J.; CARDOSO, V. L. **Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations**. Fuel Processing Technology, v. 106, p. 611–618, 2013.

LIU, Q.; Meng, X.; Li, Y.; Zhao, C. N.; Tang, G. Y.; Li, H. B. **Antibacterial and antifungal activities of spices**. International journal of molecular sciences, v. 18, n. 6, p. 1283, 2017.

LUCENA, B. T.; DOS SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L.; MOREIRA, A. P. B.; NUNES, A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F. L.; DE MORAIS, M. A *et al*. **Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process.** BMC microbiology, v. 10, n. 1, p. 298, 2010.

M. M. A. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: https://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira. Acesso em: 07 Jul. 2020.

MADALENO, L. L.; MINARI, G. D.; DE ANNUNZIO, F. R.; DE CARVALHO, M. R.; JÚNIOR, G. R. B.; SALES, D. C.; FRIGIERI, M. C. **Use of antimicrobials for contamination control during ethanolic fermentation**. Científica, v. 44, n. 2, p. 226–234, 2016.

MADALENO, L. L.; ARMOA, M. H.; SALARO, M. C. F. **Control of contamination in dilution water used in molasses must preparation.** Ciência & Tecnologia, v. 11, n. 1, p. 5-14, 2019.

MASSON, I. D. S.; COSTA, G. H. G.; ROVIERO, J. P.; FREITA, L. A. D.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. **Produção de bioetanol a partir da fermentaçãode caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar.** Ciencia rural, v. 45, n. 9, p. 1695-1700, 2015.

MOLONEY, M. G. **Natural products as a source for novel antibiotics.** Trends in Pharmacological Sciences, v. 37, n. 8, p. 689-701, 2016.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. **Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations**. Progress in Energy and Combustion Science, v. 37, n. 3, p. 351–370, 2011.

NAGHSHBANDI, M. P; TABATABAEI, M.; AGHBASHLO, M.; GUPTA, V. K.; SULAIMAN, A.; KARIMI, K.; MOGHIMI, H.; MALEKI, M. **Progress toward improving ethanol production through decreased glycerol generation in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic and genetic engineering approaches.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 115, p. 109353, 2019.

NARENDRANATH, N. V. **Bacterial contamination and control in ethanol production.** The alcohol textbook, v. 4, p. 287-298, 2003.

NAVES, R. F.; FERNANDES, F. D. S.; PINTO, O. G.; NAVES, P. L. F. **Contaminação microbiana nas etapas do processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usinas alcooleiras**. Enciclopedia Biosfera, v. 6, p. 1–16, 2010.

NIELSEN J.; LARSSON C.; VAN MARIS A.; PRONK J. **Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals**. Current Opinion in Biotechnology, v. 24, n. 3, p. 398–404, 2013.

OLIVEIRA, J. A.; GARBIN, J. R.; CAMARA, C.; FRIGIERI, M. C.; MADALENO, L. L. **Radiação Ultravioleta no controle dos micro-organismos na água de diluição e no mosto de melaço.** STAB, v. 32, n.1, p. 49-53, 2013.

PETROVSKA, B. B. **Historical review of medicinal plants' usage**. Pharmacognosy reviews, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.

PRONK, J. T.; YDE STEENSMA, H.; VAN DIJKEN, J. P. **Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae***. Yeast, v. 12, n. 16, p. 1607-1633, 1996.

RAVANELI, G. C.; GARCIA, D. B.; MADALENO, L. L.; MUTTON, M. Â.; STUPIELLO, J. P.; MUTTON, M. J. R. **Spittlebug impacts on sugarcane quality and ethanol production**. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, v. 46, n. 2, p. 120–129, 2011.

RFA. Industry statistics, **Renewable Fuels Association**, Washington, DC., USA. Disponível em: https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/. Acesso em: 7 Jul. 2020.

RICH, J. O.; BISCHOFF, K. M.; LEATHERS, T. D.; ANDERSON, A. M.; LIU, S.; SKORY, C. D. **Resolving bacterial contamination of fuel ethanol fermentations with beneficial bacteria – An alternative to antibiotic treatment.** Bioresource technology, v. 247, p. 357–362, 2018.

RICH, J. O.; LEATHERS, T. D.; BISCHOFF, K. M.; ANDERSON, A. M.; NUNNALLY, M. S. **Biofilmformation and ethanol inhibition by bacterial contaminants of biofuel fermentation.** Bioresource technology, v. *196*, p. 347-354, 2015.

ROITMAN, Tamar. **Programas internacionais de incentivo aos biocombustíveis e o RenovaBio.** Boletim de Conjuntura, n. 3, p. 19-25, 2019.

SALAM, A. M.; QUAVE, C. L. **Opportunities for plant natural products in infection control**. Current opinion in microbiology, v. 45, p. 189-194, 2018.

SALES, G. W. P.; Batista, A. H. M.; Rocha, L. Q.; Nogueira, N. A. P. **Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L.** Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences, v. 35, n. 4, 2014.

SARRIS, D.; PAPANIKOLAOU, S. **Biotechnological production of ethanol: biochemistry, processes and technologies**. Engineering in life sciences, v. 16, n. 4, p. 307-329, 2016.

SEKOAI, P. T.; MHLONGO, S. I.; EZEOKOLI, O. T. **Progress in the development of methods used for the abatement of microbial contaminants in ethanol fermentations: a review**. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, p. 1-27, 2019.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**-12ª Edição. Artmed Editora, 2016.

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Unicadata** □https://unicadata.com.br□; 2020.

UPADHYAY, A.; UPADHYAYA, I.; KOLLANOOR-JOHNY, A.; VENKITANARAYANAN, K. **Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis.** BioMed research international, v. 2014, 2014.

VIDAL, M.F. **Produção e uso de biocombustíveis no Brasil**. Caderno setorial etene, v. *2*, n. 79, p. 1-13, 2019.

WALTER, A. L.; Yang, D.; Zeng, Z.; Bayrock, D.; Urriola, P. E.; Shurson, G. C. **Assessment of antibiotic resistance from long-term bacterial exposure to antibiotics commonly used in fuel ethanol production**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 35, n. 4, p. 66, 2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation**. 2018.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. **Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 71, p. 475-501, 2017.

CAPÍTULO 3

MICROBIAL INACTIVATION IN ANIMAL WASTE WITH IONIZING RADIATION

Data de aceite: 19/01/2021
Data de submissão: 16/11/2020

María Verónica Vogt
Jose Pachado
Comisión Nacional de Energía Atómica, Departamento Procesos por Radiación
Ezeiza, Buenos Aires Argentina

Jose Pachado
Comisión Nacional de Energía Atómica, Gerencia Aplicaciones y tecnología de las Radiaciones
Ezeiza, Buenos Aires Argentina

ABSTRACT: Intensive animal husbandry aims to produce animal products in crowded conditions of cattle, pigs, poultry or fish. Those farms have in common a high population density, they are large-scale and generate large volumes of liquid and solid waste. These animal wastes contain pathogenic microorganisms that can be transmitted to man such as *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and antibiotic resistant microorganisms. These biohazards can remain in soil, water, or travel to populated regions causing adverse health effects. To reduce the environmental impact, regulations require a solid waste and wastewater management plan, but they are often not well applied. Radiation technologies appear as an emerging alternative for the treatment of these wastes because they allow reducing or eliminating the biological hazards while permitting the reuse or recycling of the organic matter present.
KEYWORDS: Microorganisms, Animal waste, Environmental contamination, Ionizing radiation.

INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM DEJETOS ANIMAIS COM RADIAÇÃO IONIZANTE

RESUMO: A pecuária intensiva visa a produção de produtos de origem animal em condições de superlotação de bovinos, suínos, aves ou peixes. Essas fazendas têm em comum uma alta densidade populacional, são de grande porte e geram grandes volumes de resíduos líquidos e sólidos. Esses resíduos animais contêm microorganismos patogênicos que podem ser transmitidos ao homem, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* e microrganismos multirresistentes a antibióticos. Esses riscos biológicos podem permanecer no solo, na agua ou viajar para regiões povoadas causando efeitos adversos à saúde. Para reduzir o impacto ambiental, os regulamentos exigem um plano de gestão de resíduos sólidos e águas residuais, mas geralmente não são bem aplicados. As tecnologias de radiação aparecem como uma alternativa emergente para o tratamento desses resíduos, pois permitem reduzir ou eliminar os riscos biológicos ao mesmo tempo que permitem o reaproveitamento ou reciclagem da matéria orgânica presente.
PALAVRAS-CHAVE: Microorganismos, Resíduos de animais, Contaminação ambiental, Radiação ionizante

1 I INTRODUCTION

The impact of human activities on environmental resources is a problem of great concern. These actions cause pollution, depletion or degradation of water, air, and soil. Contamination can be chemical, physical, or biological. An example of biological contamination are organisms such as bacteria and viruses that can cause disease in man or animals and become a public health problem. This chapter discusses the need to produce large quantities of food, some of the negative aspects that are generated with the production of animals and some problems the man must deal with. The biological risks present in waste, the treatments options, the use of ionizing radiation as a technological tool to eliminate biohazards in human waste and the need for its use in the treatment of animal waste is also discussed.

2 I ANIMAL HUSBANDRY

Wolves are recognized as the first species to be domesticated by hunter-gatherers from Europe and Asia during the Late Glacial Period (15,000-30,000 years BP). From 12,000 years BP the domestication of species became a practice in other parts of the world, which continues to the present. Animals were a source of food for human consumption, providing meat, milk, eggs, etc. This practice was part of the major changes in the way of life of human societies around the world. This led to technological and economic changes that begin with the production of food based on crops and the domestication of animals starting extensive animal husbandry on farms (VIGNE, 2011).

In the last centuries, the growth in human population, together with the increase in the standard of living in developed countries are some of the main reasons for the growing demand for animal proteins worldwide. The need of farm animals in addition to the lack of space, lead to the creation of modern livestock farming systems giving rise to the intensive animal breeding system. This has been possible thanks to scientific discoveries and technological advances. Currently, livestock is an important sector because its products contribute 17 per cent to kilocalorie consumption and 33 per cent to protein consumption globally. It employs at least 1.3 billion people globally and directly support the livelihoods of 600 million smallholder farmers. Livestock systems occupy about 30 per cent of the planet's ice-free terrestrial surface area and are a significant global asset with a value of at least $ 1.4 trillion (THORNTON, 2010).

Animal husbandry systems have both positive and negative effects depending on how they are analyzed. Currently, livestock is one of the fastest growing agricultural subsectors in developing countries, but negative effects on the environment are aspects of growing concern. One of them is that concentrated animal production generates a large amount of waste made up of food, scraps and animal waste. The disposal of these solid and liquid

waste represents a problem of great interest because, in addition to being large volumes, they could be harmful to the environment if not well managed, have strong odor, attract rodents and insects, have pathogenic microorganisms and contaminate the soil, vegetation, rivers, groundwater, and other animals (OGBUEWU et al., 2012).

3 I THE RISKS BEHIND ANIMAL WASTE

Animal waste is made up of water, food scraps, animal excrement, urine, and other waste materials such as washing and cleaning water. Waste can be solid, liquid, or semi-liquid with a mixture of the above. Many bacteria, viruses, fungi, and parasites that affect the health of animals can be found in these residues. Also, some have the potential to cause diseases in man. This is the reason why it must be properly controlled and managed to avoid polluting the environment. This contamination can occur by direct contact with animal feces, contamination of the soil or by fecal contamination of fomites, food, or water sources. This converts animal waste into hazardous waste with the potential to cause harm to human health if they are not sufficiently treated before disposal (SOYER & YILMAZ, 2020).

However, not all microorganisms that reach animal waste survive in it. Survival depends on the particular characteristics of each organism and its ability to adapt to new conditions in the waste of pH, moisture content, temperature, presence of substances such as ammonia, oxygen content, carbon and energy source, and the competition with other microorganisms (MANYI-LOH et al., 2016).

The most common issue that can arise from transmission of zoonotic microorganisms from animal waste are gastrointestinal symptoms, however, children and the immunocompromised people can be seriously affected. Among the pathogenic microorganisms, the most important because of it effects on public health are:

Escherichia coli: is a commensal bacterium of the gastrointestinal tract of many animal species. Some strains have been identified to be pathogenic. Among these strains the Shiga toxin-producing *E. coli* can cause gastrointestinal diseases such as hemorrhagic colitis (bloody diarrhea) and is responsible for hemolytic-uremic syndrome (GUY et al., 2014).

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli*: both species of the *Campylobacter* genus responsible for the highest percentage of cases of human. They are mainly related to poultry reservoirs. Can cause gastroenteritis and more severe diseases, such as Guillain-Barré syndrome, reactive arthritis, and irritable bowel disease, which strongly contribute to the disease burden (MULDER et al., 2020).

Salmonella spp.: can cause salmonellosis infection with or without symptoms, if present include diarrhea, fever, abdominal cramps, nausea, and vomiting. Additionally, may result in complications such as sepsis, meningitis, reactive arthritis, and urinary tract infections (CHRISTIDIS et al., 2020).

Another matter of concern are bacterias with antibiotic resistance genes present in manures of farms animals, and the elimination of these residues is the major dissemination route of migration to the food chain (HAN et al., 2018).

4 I ELIMINATION OF BIOHAZARDS IN ANIMAL WASTE

Animal husbandry farms can have different animal waste management systems. In extensive farming the animals waste remains directly on the ground while they are grazing. Whereas in dry lot storage, slurry storage or lagoon systems the waste in bedding is concentrated in lagoon in solid, semi-liquid or liquid state. In this condition they remain exposed to the environment and to the arrival of insects and rodents that can act as transmission vectors of pathogenic microorganisms, or by seepage can contaminate the soil or water sources.

However, animal wastes are of interest because they have high nutritional value as biological soil amendments for plant cultivation in sustainable agriculture. The management of animal waste has different strategies to reduce the impact of its generation, such as reducing waste (this approach contributes to savings natural resources), reuse (waste is collected and fed back into the production process), recycling (waste is collected, processed and used in the production of new products) or energy recovery (waste is converted into usable forms of energy such as heat, light, electricity, etc.) (MALOMO et al., 2018).

On the other hand, a safe waste facilitates its final disposal whether the system is waste reduction, reuse, recycling, or energy recovery. To eliminate or reduce the biohazards present, different methods are used or have been tested. Waste treatment can be chemically, physically but also biological. However, in many cases these treatments are not easy to apply, leave residues, are expensive, or do not meet the required sanitation standards.

Heat treatment has been evaluated as an inactivator of microorganisms in animal waste on laboratory or pilot scale. It was found that both, the temperature to be applied and the time heavily depend on the objective to be achieved. However, the process still requires industrial validation because microbial inactivation can be affected by many factors, such as the composition of animal waste, the species and physiological stage of the microorganism, and the heat source used (CHEN & JIANG, 2017).

Composting is an alternative, especially for solid waste. This is a natural process of aerobic and anaerobic decomposition by microorganisms. The product is rich in organic matter and could improve soil fertility, water-holding capacity, bulk density and biological properties. However, although it allows reducing the volume and density of the waste, it is effective in killing only some pathogens and repopulation of certain bacteria is a serious drawback (MALOMO et al., 2018).

MACAULEY et al. (2005) studied the disinfection of liquid residues of swine with chlorine. They found that a concentration of 30 mg/L in lagoons water reduced the microbial population by 2.2-3.4 log, but higher concentrations did not increase inactivation due to the

presence of chlorine resistant species. Chlorine has the advantage of low cost, but it leaves residues that are potentially mutagenic, so emphasis is placed on its replacement (WARD & DEGRAEVE, 1980).

Ultraviolet radiation is an effective disinfection method especially for liquid waste. The invisible light rays beyond the violet of spectrum can kill all types of bacteria and spores. But the effective penetration of the rays in water is only for a depth of 30 cm and it unlikely to be economically viable due to its high energy cost (WARD & DEGRAEVE, 1980.)

Ionizing radiation is a method used for the treatment of human and industrial waste but more attention should be paid as treatment of animal waste. Radiation has several advantages over the traditional methods. The interaction of radiation with molecules in an aqueous medium allows reducing pathogens concentration to a safe level, can oxidize organic pollutants such as antibiotics, and convert nonbiodegradable substances into more readily degradable ones and odors are reduced (WANG & WANG, 2007; MARUTHI et al., 2011).

5 I IONIZING RADIATION TO ELIMINATE BIOHAZARDS

The radiation technology allows processing the waste by 2 ways. One is the use of a gamma ray source such as ^{137}Cs or ^{60}Co. Gamma rays have a good penetration, which ensures that the radiation effect reaches a thick layer of the treated waste. The other option of ionizing energy is electron accelerator, which accelerates charged particles in only one direction. These machines do not include a radioactive source and are classified according to the energy range of the electron beams, but since they are particles, the penetration is lower, although the dose rate in high-energy accelerators is several orders higher than gamma ray (WANG & WANG, 2007).

The interaction of radiation with living cells is well known. Although all components of prokaryotic cells are affected by photons (gamma rays) or particles (electron accelerators), the most sensitive is DNA (deoxyribonucleic acid). The damage is produced both by direct effect of radiation and by the indirect effect generated by free radicals such as the hydroxyl radical that are formed when radiation interacts with water, producing its lysis. In prokaryotic cells radiation can cause breaks in one or both strands of DNA that cause non-lethal (repairable), sublethal or lethal damage. The accumulation of damage within a cell leads to cell death. The sensitivity of an organism to radiation is conveniently expressed as the absorbed dose required to kill 90% of the present population and the result is expressed by the D_{10} value. This decimal reduction dose is affected by irradiation conditions in which the microorganisms exist: in dry or freezing, aerobic or anaerobic conditions (GINOZA, 1967).

Ionizing radiation has widely shown its biocidal potency on different substrates. An example is sewage sludge obtained from wastewater treatment plants. This waste is of interest because of the organic matter that makes it a source of nutrients such as land

fertilizer or soil conditioner. Also contains macronutrients such as nitrogen and phosphorus, essential to plant and animal growth, and micronutrients such as zinc, iron, and copper. However, since they are made up of human waste, they contain pathogenic microorganisms capable of contaminating water and food sources, and they require decontamination prior to their disposal in the environment (BORRELY et al., 1998).

The microbial inactivation in waste started in the 50's when LOWE et al., (1956) published results of microbial inactivation with gamma rays in water, sewage, and sewage sludge. They exposed a solution of sewage in water (1:1) to a source of ^{60}Co and observed a reduction of 93% of the bacterial population with 0.5 kGy.

Later studies were carried out on different irradiation conditions and microorganism tested to strengthen the original studies. ETZET et al. (1969) and PANDYA et al. (1987) analyzed the elimination of native and suspended bacterial in sewage samples. They described the survival characteristics of the microbial population obtained from aerobic and anaerobic digesters. The results of ETZET et al. (1969) showed 2 kGy was enough to eliminate 5 logs of fecal coliforms, while PANDYA et al., 1987, eliminated 6 logs of a radioresistant *Bacillus* spp. with 10 kGy.

Time after, the use of electron accelerators for the inactivation of microorganisms in sewage sludge was analyzed and well received for its advantages by not requiring a radioactive source. PRAVEEN et al., 2013 studied the sensitivity of bacteria and aerobic, anaerobic spores and viruses, both naturally present bacteria and spiked virus (rotavirus, poliovirus, coliphagos) of sewage sludge obtained from aerobic and anaerobic digesters. The inactivation was study with a high energy accelerator (10 MeV). All the microorganisms were sensitive to radiation, but in different levels. The D_{10} values were of 0.23 - 4.96, being the bacterial pathogens the most sensitive, while both, the anaerobic spores and the coliphages the most resistant.

The ability to eliminate or significantly decrease the levels of microbial pathogens and indicator organisms such as total or fecal coliforms in sewage sludge allows transforming Class B sludge (with sanitary restrictions for its application on the ground due to its high content of coliform bacteria) into Class A sludge, which does not have sanitary restrictions for application on the ground. Regulations in many countries already include treatment with 10 kGy of ionizing radiation as an effective method to produce Class A biosolids.

For instance, India has 2 sewage sludge treatment plants for sanitation purposes. The oldest is in Vadodara, Gujarat and has been operating with liquid sludge for more than 20 years. Recently a dry sewage sludge irradiation facility was officially opened in Ahmedabad. This fully automatic plant will sanitize 100 tons of dry sludge every day. Subsequently, the sludge will then be inoculated with useful bacteria to provide a value-added bio-fertilizer (VARSHNEY, 2016).

Reducing the impact of human activities for environmental care is a matter of concern that is not discussed. The treatment of wastewater and sludge from household effluents is

a topic that is widely addressed and for which there are treatment plants. Animal waste generated on farms by intensive animal husbandry requires special attention due to the large volumes generated and the presence of pathogenic microorganisms. There are few studies carried out on these substrates to reuse animal waste. As an example, FARAG & MOHAMED (1999) studied the decontamination of broiler manure and cow manure with gamma irradiation to improve the microbiological safety of the waste and used it to feed chickens.

A comparative cost analysis for wastewater treatment between electron accelerators, ozone and UV showed that for volumes greater than 50,000 m^3/day the treatment with electron accelerators has a lower cost (0.041-0.073 US \$/m^3) including costs of operation, capacity and discharge (MARUTHI et al., 2011; HOSSAIN et al., 2018).

Finally, in the treatment of effluents the use of radiation for sanitation purposes is environmentally friendly in comparison with chemical process that leaves toxic residues. The application of these technologies in a safe way and with the physical protection of radioactive material can ensure sustainable water resources.

6 | CONCLUSIONS

The current intensive animal husbandry systems were created in response to the growing needs of the human population for food. One of the negative aspects of this activity is the risk of transmission of zoonotic pathogens to man and other animals. There are multiple forms of treatment, however all have their advantages or disadvantages, for that reason, taking into account all the scientific and technological background the use of ionizing radiation plays an important role for sanitary purposes that allows to reduce microbial contamination without leaving residues. Both gamma rays and electron accelerators are recognized technology and have the disinfection potential for the treatment of sewage sludge and wastewater. Also are presented as an alternative technology for animal waste sanitization transforming hazardous waste into safe organic matter that can be used in other processes such as composting.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank the support of the National Atomic Energy Commission from Argentina and the International Atomic Energy Agency for their contribution with the Project: CRP Project F23033: “Radiation inactivation of biohazards using high powered electron beam accelerators”, contract title: “Decontamination by irradiation of biohazardous waste from laboratory animal facility”.

REFERENCES

BORRELY, S. I.; CRUZ, A. C.; DEL MASTRO, N. L.; SAMPA, M. H. O.; SOMESSARI, E. S. **Radiation**

processing of sewage and sludge. A review. Progress in Nuclear Energy, v. 33, n. 1-2, 1998.

CHEN, Z.; JIANG, X. **Microbiological safety of animal wastes processed by physical heat treatment: an alternative to eliminate human pathogens in biological soil amendments as recommended by the food safety modernization Act.** Journal of Food Protection, v. 80, n. 3, p. 392-405, 2017.

CHRISTIDIS, T.; HURST, M.; RUDNICK, W.; PINTAR, K. D. M.; POLLARI, F. **A comparative exposure assessment of foodborne, animal contact and waterborne transmission routes of *Salmonella* in Canada**. Food Control, v. 109, 106899, 2020.

ETZEL, J. E.; BORN, G. S.; STEIN, J.; HELBING, T. J.; BANEY, G. **Sewage sludge conditioning and disinfection by gamma irradiation**. American Journal of Public Health and the Nations Health, v. 59, n. 11, p. 2067-2076, 1969.

FARAG, M. D. E.-D. H.; MOHAMED, F. A. **Effect of radiation processing as an integral part of the safe recycling animal waste**. Animal Feed Science and Technology, v. 77, n. 3-4, p. 267-280, 1999.

GINOZA, W. **The Effects of Ionizing Radiation on Nucleic Acids of Bacteriophages and Bacterial Cells**. Annual Review of Microbiology, v. 21, n. 1, p. 325-368, 1967.

GUY, R.A.; TREMBLAY, D.; BEAUSOLEIL, L.; HAREL, J.; CHAMPAGNE, M.J. **Quantification of E. coli O157 and STEC in feces of farm animals using direct multiplex real time PCR (qPCR) and a modified most probable number assay comprised of immunomagnetic bead separation and qPCR detection**. Journal of Microbiological Methods, v. 99, p. 44-53. 2014.

HAN, X.-M.; HU, H.-W.; CHEN, Q.-L.; YANG, L.-Y.; LI, H.-L.; ZHU, Y.-G.; LI, X.-Z.; MA, Y.-B. **Antibiotic resistance genes and associated bacterial communities in agricultural soils amended with different sources of animal manures**. Soil Biology and Biochemistry, v. 126, p. 91-102, 2018.

HOSSAIN, K.; MARUTHI, Y. A.; DAS, N. L.; RAWAT, K. P.; SARMA, K. S. S. **Irradiation of wastewater with electron beam is a key to sustainable smart/green cities: a review**. Applied Water Science, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

LOWE, H. N.; LACY, W. J.; SURKIEWICZ, B. F.; JAEGER, R. F. **Destruction of Microorganisms in Water, Sewage, and Sewage Sludge by Ionizing Radiations**. Journal - American Water Works Association, v. 48, n. 11, p. 1363-1372, 1956.

MACAULEY, J. J., QIANG, Z., ADAMS, C. D., SURAMPALLI, R., & MORMILE, M. R. **Disinfection of swine wastewater using chlorine, ultraviolet light and ozone**. Water Research, v. 40, n. 10, p. 2017-2026, 2006.

MALOMO, G. A.; MADUGU, A. S.; BOLU, S. A. **Chapter 8: Sustainable Animal Manure Management Strategies and Practices**. *In*: ALADJADJIYAN, A. (Org.). Agricultural Waste and Residues. IntechOpen, 2018, p. 119-137.

MANYI-LOH, C.; MAMPHWELI, S.; MEYER, E.; MAKAKA, G.; SIMON, M.; OKOH, A. **An Overview of the Control of Bacterial Pathogens in Cattle Manure**. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 13, n. 843, p. 1-27, 2016.

MARUTHI, Y. A.; DAS, N. L.; HOSSAIN, K.; SARMA, K. S. S.; RAWAT, K. P.; SABHARWAL, S. **Disinfection and reduction of organic load of sewage water by electron beam radiation**. Applied Water Science, v. 1, n. 1-2, p. 49-56, 2011.

MULDER, A. C.; FRANZ, E.; DE RIJK, S.; VERSLUIS, M. A. J.; COIPAN, C.; BUIJ, R.; MÜSKENS, G.; KOENE, M.; PIJNACKER, R.; DUIM, B.; BLOOIS, L. G.; VELDMAN, K.; WAGENAAR, J. A.; ZOMER, A. L.; SCHETS, F. M.; BLAAK, H.; MUGHINI-GRAS, L. **Tracing the animal sources of surface water contamination with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli***. Water Research, v. 187, n.

116421, p. 1-12, 2020.

OGBUEWU, I. P.; ODOEMENAM, V. U.; OMEDE, A. A.; DURUNNA, C. S.; EMENALOM, O. O.; UCHEGBU, M. C.; OKOLI, I. C.; ILOEJE, M. U. **Livestock waste and its impact on the environment**. Scientific Journal of Review, v.1, n. 2, p. 17-32, 2012.

PANDYA, G. A.; KAPILA, S.; KELKAR, V. B.; NEGI, S.; MODI, V. V. **Inactivation of bacteria in sewage sludge by gamma radiation.** Environmental Pollution, v. 43, n. 4, p. 281-290, 1987.

PRAVEEN, C.; JESUDHASAN, P. R.; REIMERS, R. S.; PILLAI, S. D. **Electron beam inactivation of selected microbial pathogens and indicator organisms in aerobically and anaerobically digested sewage sludge**. Bioresource Technology, v. 144, p. 652-657, 2013.

SOYER, G.; YILMAZ, E. **Waste Management in Dairy Cattle Farms in Aydın Region. Potential of Energy Application**. Sustainability, v. 12, n. 4, p. 1-11, 2020.

THORNTON, P. K. **Livestock production: recent trends, future prospects**. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 365, n. 1554, p. 2853-2867, 2010.

VARSHNEY, L. **Radiation Technology for Sewage Sludge Hygienisation**. Barc Newsletter, n. January – February, p. 27-31, 2016.

VIGNE, J.-D. **The origins of animal domestication and husbandry: A major change in the history of humanity and the biosphere**. Comptes Rendus Biologies, v. 334, n. 3, p. 171-181, 2011.

WANG, J.; WANG, J. **Application of radiation technology to sewage sludge processing: A review**. Journal of Hazardous Materials, v. 143, n. 1-2, p. 2-7, 2007.

WARD, R. W.; DEGRAEVE, G. M. **Acute residual toxicity of several disinfectants in domestic and industrial waste water**. Journal of the American Water Resources Association, v. 16, n. 1, p. 41-48, 1980.

CAPÍTULO 4

PESQUISA DE INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO NA CARNE DE CHARQUE COMERCIALIZADA EM SUPERMERCADOS E FEIRAS LIVRES

Data de aceite: 19/01/2021

Larissa Karine Barbosa
http://lattes.cnpq.br/3970213791998161

Maria Aduclécia de Lima
http://lattes.cnpq.br/6235812211027075

Adayane Camila da Silva
http://lattes.cnpq.br/9892368363427954

João Victor Bezerra Gonçalves Melo
http://lattes.cnpq.br/8140462684830251

José Agostinho Alves Pereira Filho
http://lattes.cnpq.br/6178560583650051

André Victor Barbosa Julião
http://lattes.cnpq.br/6429555609746888

Agenor Tavares Jacome Junior
http://lattes.cnpq.br/3765760153191048

RESUMO: A charque é um produto cárneo salgado e desidratado da carne bovina. A utilização de matéria prima de qualidade insatisfatória e condições higiênicas precárias, durante a produção e comercialização, pode resultar em produto com elevada carga de microrganismos patogênicos e indicadores de contaminação, como a *Salmonella spp, Shigella spp,* coliformes totais e termotolerantes e bactérias halofílicas que indicam contaminação por material fecal e contaminação do sal. O objetivo do estudo foi avaliar a presença de indicadores de contaminação na carne de charque de supermercados e feiras livres. Foram coletadas 36 amostras de carne de charque em 2 feiras e 6 supermercados localizados no município de Caruaru-PE. As análises bacteriológicas foram realizadas através das técnicas dos tubos múltiplos (coliformes totais e termotolerantes), *Spread Plate* (*Salmonella spp.* e *Shigella spp.*) e *Pour Plate* (Bactérias Halofílicas). As amostras confirmaram a presença de 94,4% coliformes totais, 16,7% para coliformes termotolerantes, 30,5% foram positivas para *Salmonella spp;* 52,8% confirmaram para *Shigella spp e* todas as amostras tiveram contagem de bactérias halofílicas acima de 10^4 UFC/g. Diante dos resultados, conclui-se que as condições higiênicas destes alimentos oferecidos pelos comerciantes estavam abaixo do padrão exigido pela RDC 331/2019 ANVISA.

PALAVRAS-CHAVE: Contaminantes. Carne. Bactérias. Microbiologia de Alimentos.

RESEARCH OF CONTAMINATION INDICATORS IN BEEF JERKY SOLD IN SUPERMARKET AND FAIRS

ABSTRACT: Beef jerky is a salted and dehydrated meat product from beef. The use of raw material of unsatisfactory quality and poor hygienic conditions, during production and commercialization, can result in a product with a high load of pathogenic microorganisms and contamination indicators, such as *Salmonella spp*, *Shigella spp*, total and thermotolerant coliforms and halophilic bacteria that indicate contamination by faecal material and salt contamination. The aim of the study was to evaluate the presence of contamination indicators

in beef jerky from supermarkets and open markets. 36 samples of beef jerky were collected at 2 fairs and 6 supermarkets located in the municipality of Caruaru-PE. Bacteriological analyzes were performed using multiple tube techniques (total and thermotolerant coliforms), Spread Plate (*Salmonella spp*. and *Shigella spp*.) and Pour Plate (Halophilic Bacteria). The samples confirmed the presence of 94.4% total coliforms, 16.7% for thermotolerant coliforms, 30.5% were positive for *Salmonella spp*; 52.8% confirmed it for *Shigella spp* and all samples had a halophilic bacteria count above 10^4 CFU / g. In view of the results, it is concluded that the hygienic conditions of these foods offered by traders were below the standard required by RDC 331/2019 ANVISA.
KEYWORDS: Contaminants. Beef. Bacteria. Food Microbiology.

INTRODUÇÃO

A charque é um produto cárneo típico brasileiro, obtido por desidratação da carne bovina, através da salga e exposição ao sol, de longa preservação. A carne de charque é definida pela legislação brasileira, como um produto de 40 a 50% de umidade, 10 a 20% de sal dentro da porção muscular[1]. A charque tem como característica uma cor mais escurecida, sabor mais salgado e tende a ser mais rígido[2].

O processo de elaboração do charque consiste em remover água do tecido animal, inicialmente pela alteração da pressão osmótica provocada pela salga e, posteriormente, pela secagem, geralmente ao sol[3].

O uso de matéria prima de qualidade microbiológica inadequada, bem como condições insatisfatórias de higiene durante e após o processamento do charque, pode resultar em produto com elevada carga microbiana[4]. Caso esses micro-organismos não sejam destruídos durante o processamento, podem multiplicar-se durante a produção, distribuição e comercialização dos alimentos, reduzindo a qualidade e aumentando o risco de provocar surtos5.

Os estabelecimentos de derivados cárneos sejam eles comerciais ou de beneficiamento devem possuir condições higiênico-sanitárias para impedir os fatores favoráveis à multiplicação de microrganismos ou outros efeitos danosos aos produtos. Nas feiras livres os riscos de contaminação se elevam, pois os alimentos são expostos em barracas sem refrigeração, sem proteção contra poeiras e insetos, tornando-se um ambiente propício para incorporar externamente materiais estranhos de origem biológica ou não[6].

Mesmo sendo um produto que utiliza de uma estratégia de preservação que retarda o crescimento microbiano, através do aumento da pressão osmótica gerado pela alta concentração de sais, a carne de charque pode ter essa barreira de proteção vencida pelas baixas condições de higiene no armazenamento, transporte e comercialização. A falsa sensação de proteção robusta poderá fazer com que comerciantes e consumidores se acomodem com outros fatores que poderiam vir a deixar a carne de charque susceptível a contaminação por microrganismos. Esse trabalho servirá para avaliar se o aumento da

pressão osmótica é suficiente para manter esse produto cárneo protegido.

REVISÃO DE LITERATURA

Indicadores de Contaminação

Microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento[7].

Segundo a ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), microrganismos indicadores podem ser agrupados em: (I) microrganismos que não oferecem riscos à saúde (mesófilos, psicrotróficos, termófilos, bolores e leveduras). (II) microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde (coliformes totais, coliformes fecais enterococos, enterobactérias totais, Escherichia coli)[8].

Os padrões microbiológicos estabelecem os limites máximos toleráveis de contaminação de um grupo ou espécie de microrganismo para cada tipo de alimento. Esses limites são determinados por metodologias estipuladas, visando proteger a saúde pública e/ou o alimento. Os padrões têm caráter legal podendo ser federal, estadual ou municipal.

Coliformes Totais

Este grupo é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35-37ºC, por 48 horas. São bacilos gram-negativos e não formadores de esporos; fazem parte desse grupo predominantemente bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destes, apenas a *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais homeotérmicos. Conseqüentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos[9].

Coliformes Termotolerantes

De acordo com Franco[7], as bactérias pertencentes a este grupo correspondem aos coliformes totais que apresentam a capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás, quando incubadas a temperaturas de 44-45ºC. O principal representante deste grupo é a *Escherichia coli*. A pesquisa de coliformes termotolerantes ou *E. coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos.

Salmonella

As salmonelas pertencem à família *Enterobacteriaceae*, sendo que, morfologicamente, são bastonetes Gram negativos, geralmente móveis, capazes de formar ácido e, na maioria das vezes, gás a partir da glicose. A maioria das salmonelas de interesse clínico não fermenta lactose, contudo, muitas cepas podem adquirir essa característica por meio de transferência plasmidial[10].

As gastroenterites são frequentemente chamadas de intoxicação alimentar, termo que enfatiza a transmissão das salmonelas pelos alimentos. Clinicamente, caracteriza-se por diarréia aguda geralmente acompanhada de náuseas, dor de cabeça e, às vezes, febre e vômito[11].

Shigella

As bactérias do gênero Shigella são micro-organismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, assim como Salmonela. São bastonetes gram negativos, não formadores de esporos, imóveis, aeróbios facultativos. Ao contrário da Salmonela e *Escherichia*, a *Shigella* não apresenta reservatórios animais que não sejam os humanos[12].

A doença causada por *Shigella* é denominada shigelose (disenteria bacilar), que é uma doença inflamatória do trato gastrointestinal. Os principais sintomas nas pessoas infectadas são cólicas abdominais, febre e diarreia, sendo que um indivíduo doente pode ter até 20 evacuações por dia. O quadro clínico é mais acentuado, prolongado e provoca maiores complicações que os demais micro-organismos. A shigelose é responsável pela morbidade e mortalidade em populações de alto risco, como, crianças menores de 5 anos, idosos, dentre outras12.

Bactérias Halofílicas

Segundo o autor Jay[13] as bactérias halofílicas são incapazes de se desenvolver em meios sem cloreto de sódio e frequentemente exigem altos teores dessa substância para seu desenvolvimento. São geralmente bactérias e comumente mais tolerantes ao sal que organismos não halofílicos.

Os microrganismos ligeiramente halofílicas, que crescem em meio contendo de 2% a 5% de sal, são de origem marinha, principalmente dos gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium*. Aqueles que crescem em meios contendo de 5% a 20% de sal são chamados de moderadamente halófilos tendo como exemplos as bactérias das famílias *Bacillacceae* e *Micrococcaceae*. Bactérias que crescem em meios contendo concentrações de 20% a 30% de sal são extremamente halofílicas como o *Halobacterium spp* e *Halococcus spp*. O pH ótimo para crescimento situa-se entre 5,0 e 7,5. As bactérias halofílicas provocam contaminação e deixam uma cor vermelha na carne, geralmente de peixe ou carnes brancas[13].

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 36 amostras de charque em 2 feiras e 6 supermercados na cidade de Caruaru-PE, entre fevereiro de 2019 à fevereiro de 2020. Sendo incluídas peças comercializadas nos pontos objetivados, e excluídas aquelas que apresentaram alterações organolépticas não indicadas ao consumo (alteração de cor, odor e aspecto físico).

As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas contendo baterias de gelo a temperatura de 4°C para o Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico de Alimentos do Centro Universitário Tabosa de Almeida - Asces/Unita.

A redução da amostra bruta se deu por meio da trituração dos alimentos seguido do seu quarteamento, sendo desprezados 2/4 do peso total, gerando com isso a amostra de laboratório. Em seguida 100 g (50%) de cada amostra foram liquefeitas em 300 mL de solução salina estéril com o uso de um liquidificador industrial (METVISA LOL6) previamente esterilizado por meio de autoclavagem a 121°C/15min. Todos os procedimentos foram feitos em condições estéreis dentro de uma capela de fluxo laminar. Do caldo obtido das amostras foram retiradas alíquotas para a realização das análises bacteriológicas.

A investigação bacteriológica se deu através da pesquisa da presença de Coliformes totais e termotolerantes, fazendo uso da técnica dos tubos múltiplos, como recomendada pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, sendo utilizados os meios de cultura: Caldo Lactosado (etapa presuntiva), Caldo Verde Brilhante Bile a 2% (etapa confirmatória) e Caldo EC (coliformes termotolerantes) para este método.

Na determinação do gênero de Salmonella e Shigella, foi utilizada a técnica *Spread Plate* com Ágar SS. Transferindo 1mL de cada amostra diluída (10^2), os inóculos foram espalhados pela placa contendo o meio com auxílio de uma alça de *Drigalski*. Após completa absorção da amostra, as placas foram incubadas de forma invertida em estufa, sob temperatura de 35ºC durante 24 horas. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g

Para contagem de bactérias halofílicas foi transferido 1 mL de cada diluição (10^2) para placas de Petri estéreis, utilizando-se a técnica de *Pour Plate*. Em seguida, 15 mL de Plate Count Agar (PCA), com 2% de NaCl, foi vertido sobre o inóculo, homogenizado e incubado a 37°C por 24 horas. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g.

Os dados alcançados form armazenados em um banco de dados utilizando o aplicativo Excel, sendo expressos por meio dos valores encontrados de Número Mais Provável (NMP) do microrganismo de interesse por grama de alimento (NMP/g), obtidos através da Tabela de Hoskins. Trata-se de um estudo com uso de estatística descritiva.

RESULTADOS

Os resultados obtidos na pesquisa foram registrados e expresso pelos valores encontrados de Número Mais Provável (NMP) dos microrganismos de interesse por grama de alimentos (NMP/g) obtido através pela tabela de Hoskins. Foi desenvolvido um índice (Tabela 1) para classificar o grau de contaminação das amostras analisadas, tendo como base os valores de NMP/g, para que pudesse estabelecer o índice de contaminação pelo grupo coliformes.

Índice de contaminação	Classificação	NMP/g
0	Negativo	< 1,8
1	Baixo	1,8 a 10
2	Intermediário	11 a 90
3	Alto	91 a 900
4	Muito Alto	> 900

Tabela 1. Índice de contaminação microbiana expresso em NMP/g.

Das 18 amostras analisadas procedente de estabelecimentos comerciais, 94,5% apresentaram presença de coliformes totais e nenhuma apresentou coliformes termotolerantes. Também foram analisadas um total de 18 amostras provenientes de Feiras livres onde, 94,5% das amostras apresentaram presença de coliformes totais e 16,7% a presença das termotolerantes.As Figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, a distribuição dos resultados. A presença de bactérias halofílicas, Salmonela e Shigella é descrita nas Tabelas 2, 3 e 4.
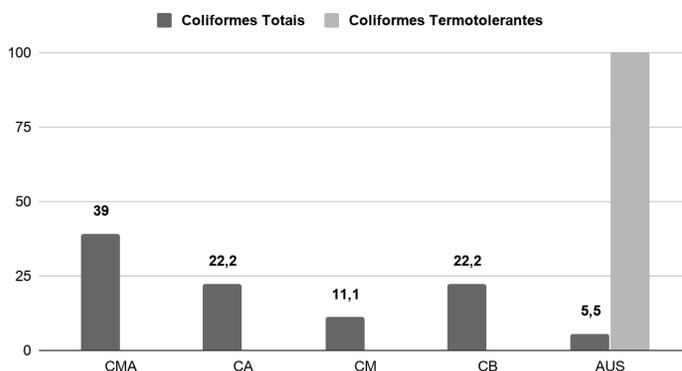
Figura 1. Resultados de amostras (%) provenientes de supermercados, com presença de coliformes totais e termotolerantes. Aus (Ausência - Negativo); CB(Concentração Baixa); CM (Concentração Mediana - Intermediária); CA (Concentração Alta); CMA (Concentração Muito Alta). Classificação de acordo com a Tabela 1.
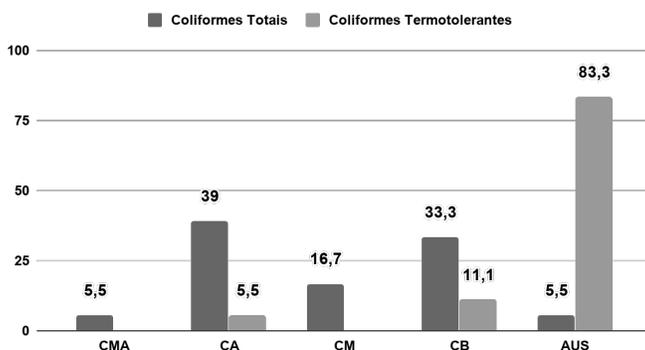
Figura 2. Resultados de amostras (%) provenientes de Feiras Livres, positivas para coliformes totais e termotolerantes. Aus (Ausência - Negativo); CB(Concentração Baixa); CM (Concentração Mediana - Intermediária); CA (Concentração Alta); CMA (Concentração Muito Alta). Classificação de acordo com a Tabela 1.

Bactérias Halofílicas		
	% de amostras positivas	**Média±DP (UFC/g)**
Supermercados	100	$6,9 \pm 3 \times 10^6$
Feiras Livres	100	$1,23 \pm 1 \times 10^4$

Tabela 2. Resultado de amostras (%) de Supermercados e Feiras Livres, positivas para Bactérias Halofílicas

Salmonella spp.		
	% de amostras positivas	**Média±DP (UFC/g)**
Supermercados	55,5	$1,18 \pm 0,2 \times 10^5$
Feiras Livres	5,5	$1 \pm 0,1 \times 10^2$

Tabela 3. Resultado de amostras (%) de supermercados e feiras livres, positivas para *Salmonella spp.*

Shigella spp.		
	% de amostras positivas	**Média±DP (UFC/g)**
Supermercados	22,2	$1,4 \pm 0,8 \times 10^6$
Feiras Livres	83,3	$1,24 \pm 0,3 \times 10^4$

Tabela 4. Resultado de amostras (%) de supermercados e feiras Livres, positivas para *Shigella spp.*

DISCUSSÃO

Segundo a RDC 331/2019 da ANVISA[14], seriam reprovados apenas os produtos cárneos que tivessem a presença de *Salmonella spp.* e *E.coli* a uma concentração de > 100 UFC/g. O que reprovaria aproximadamente 55% das amostras de supermercado, 16,6% de amostras de feiras livres e aprovaria todas as demais amostras, mesmo estas contendo alta carga microbiológica de outros microrganismos.

Além disso, na lei também não é mencionada a presença de microrganismo que indicam contaminação por condições higiênicas precárias, como é o caso das bactérias halofílicas que indicam contaminação sal utilizado no preparo. Também podemos citar os coliformes totais que fazem parte de um grupo de bactérias não-patogênicas, entretanto, sua presença indica que o produto esteve em contato com material fecal. E ainda a presença da *Shigella spp.* um microrganismo patogênico, responsável pela Shiguelose.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, a carne de charque analisada pode ser classificada como uma fonte de risco à saúde pública, visto que foram detectados microrganismos patogênicos e oportunistas que comprovam desvios na qualidade microbiológica das amostras, sugestivas de más condições higiênico-sanitárias, as quais o produto pode ter sido exposto entre a etapa de processamento até a comercialização. Vale ressaltar que, com a presença de bactérias contaminantes do sal, fica evidente que a salga, que deveria servir como proteção a possíveis contaminantes não apresenta total eficácia. Fica evidente, também, que a lei assim como a fiscalização, deveriam passar por mudanças, agindo com mais cautela e rigor. Ainda vale ressaltar a importância do controle de qualidade, assim como embalagens que protejam o alimento de contato com possíveis contaminantes após a produção, objetivando a diminuição da contaminação do produto final, fornecendo aos consumidores produtos com melhores condições.

REFERÊNCIAS

1 - Lara JAF, Senigalia SWB, Oliveira TCR, et al. Evaluation of Survival of Staphylococcus aureus and Clostridium botulinum in Charqui Meats. Meat Science. Meat Science, 31 Aug 2003, 65(1):609-613.

2 - Farias SMOC. Qualidade da carne de sol comercializada na cidade de João Pessoa-PB. [Dissertação]. [João Pessoa]: Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa; 2010. 142p.

3 - Facco EMP. Parâmetros de qualidade do charque relacionados ao efeito da suplementação de vitamina E na dieta de bovinos da raça Nelore em confinamento. [Dissertação]. [Campinas]: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos; 2002. 91p.

4 - Shimokomaki M, Olivio, R, Terra, NN, et al. Atualidades em ciência e tecnologia de carnes. São Paulo: Livraria Varela; 2006. p - 236.

5 - Kunigk, L, Almeida MC. Action of peracetic acid on Escherichia coli and Staphylococcus aureus in suspension or settled on stainless steel surfaces. Brazilian Journal of Microbiology, 2001, *32*(1): 38-41.

6 - Almeida RBD, Silva P, Andrade LP, et al. Condições higiênico-sanitárias da comercialização de carnes em feiras livres de Paranatama, PE. Alimentos e Nutrição Araraquara, 2012 22(4): 585-592.

7 - Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos**.** São Paulo: Ed. Atheneu. São Paulo; 2004. p. 27-28.

8 - Silva MC. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate. [Tese]. [Piracicaba]: Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo; 2002.

9 - Cunha MAD, Silva MR.. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. Saúde & Ambiente em Revista, 2006, 1, (1): 09-13.

10 - Ministério da Saúde. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial**.** Brasília-DF, 2011. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>

11 - Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia 4ª ed**.** São Paulo**:** Ed. Atheneu; 2005. p. 175-178

12 - Cunha FPL, Vilela MLAS, Maximiano T, et al. Shigella spp.: um problema de saúde pública. Higiene Alimentar, Jan/Fev 2017, 31 (264/265).

13 - Jay JM. Microbiologia de Alimentos. São Paulo: Artmed; 2005. p - 712.

14 - Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução n° 331, de 23 de dezembro de 2019. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. 26 de Dez de 2019

CAPÍTULO 5

PESQUISA DE INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO EM VERDURAS COMERCIALIZADAS EM FEIRAS LIVRES E SUPERMERCADOS DA CIDADE DE CARUARU- PE

Data de aceite: 19/01/2021

Maria Aduclecia de Lima
http://lattes.cnpq.br/6235812211027075

Larissa Karine Barbosa
http://lattes.cnpq.br/3970213791998161

Adayane Camila da Silva
http://lattes.cnpq.br/9892368363427954

João Victor Bezerra Gonçalves Melo
http://lattes.cnpq.br/8140462684830251

José Agostinho Alves Pereira Filho
http://lattes.cnpq.br/6178560583650051

André Victor Barbosa Julião
http://lattes.cnpq.br/6429555609746888

Agenor Tavares Jacome Junior
http://lattes.cnpq.br/3765760153191048

RESUMO: Verduras são alimentos presentes nas refeições cotidianas devido a sua boa qualidade nutricional. Entretanto, se manipuladas e armazenadas inadequadamente se tornam alvo de microrganismos patogênicos ou que indicam contaminação, como é o caso de coliformes totais e termotolerantes, bactérias heterotróficas e *Pseudomonas aeruginosa* que indicam contaminação por materiais fecais e orgânicos em decomposição, respectivamente. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de microrganismos indicadores de contaminação em verduras comercializadas em mercados e feiras livres. Trata-se de um estudo experimental laboratorial. Foram coletadas 42 amostras de alface. A coleta foi realizada nas duas principais feiras e em 8 estabelecimentos comerciais localizados no município de Caruaru-PE. As análises bacteriológicas foram realizadas através das técnicas dos tubos múltiplos (coliformes totais e termotolerantes), *Spread Plate* (*Pseudomonas aeruginosa*) e *Pour Plate* (Bactérias Heterotróficas). Foram obtidos os seguintes resultados: 95,2% das amostras positivaram para a presença de coliformes totais, 23,8% para coliformes termotolerantes, todas as amostras tiveram contagem de bactérias heterotrófica acima de 10^7 UFC/g e 35,8% foram positivas para *P. aeruginosa*. Diante dos resultados encontrados, conclui-se que as condições higiênicas destes alimentos oferecidos pelos comerciantes apresentam fragilidades e devem ser otimizadas.

PALAVRAS-CHAVE: Contaminantes. Verduras. Microbiologia de alimentos. Bactérias. Enterobacter.

SEARCH FOR CONTAMINATION INDICATORS IN VEGETABLES AT FREE FAIRS AND SUPERMARKETS IN THE CITY OF CARUARU-PE

ABSTRACT: Vegetables are foods present in everyday meals due to their good nutritional quality. However, if handled and stored improperly, they become the target of pathogenic microorganisms or that indicate contamination, as is the case of total and thermotolerant coliforms, heterotrophic bacteria and *Pseudomonas aeruginosa* that indicate contamination by decomposing fecal and organic materials, respectively. This study aimed

to evaluate the presence of microorganisms that indicate contamination in vegetables sold in markets and open markets. This is an experimental laboratory study. 42 samples of lettuce were collected. The collection was carried out in the two main fairs and in 8 commercial establishments located in the municipality of Caruaru-PE. Bacteriological analyzes were performed using multiple tube techniques (total and thermotolerant coliforms), Spread Plate (*Pseudomonas aeruginosa*) and Pour Plate (Heterotrophic Bacteria). The following results were obtained: 95.2% of the samples were positive for the presence of total coliforms, 23.8% for thermotolerant coliforms, all samples had heterotrophic bacteria counts above 10^7 CFU / g and 35.8% were positive for *P aeruginosa*. In view of the results found, it is concluded that the hygienic conditions of these foods offered by traders have weaknesses and should be optimized.
KEYWORDS: Pollutants**.**Vegetables. Food Microbiology. Bacterias. Enterobacter.

INTRODUÇÃO

Feiras livres e supermercados são grandes comércios de frutas, verduras e hortaliças[1]. São ambientes frequentados por grande parcela da população, os quais, oferecem aos seus consumidores a possibilidade de comparação entre os diversos produtos ofertados[2]. Para tal, um produto exposto nas gôndolas deve possuir adequadas características sensoriais e bom valor nutricional, bem como boas condições de higiene para que satisfaçam as necessidades do cliente[3].

A qualidade higiênico-sanitária destas feiras, bem como de supermercados, tem sido discutida amplamente por ser um fator importante de segurança alimentar de modo a evitar contaminações e toxicoinfecções[1]. Apesar disso, o controle sanitário destes locais normalmente é inadequado em função do número reduzido de fiscais[4]. Faz-se necessário uma constante vigilância em torno da qualidade do ambiente e manipulação onde estão expostos os alimentos, estes, devem se adequar a diversas exigências até chegarem ao consumidor final[5].

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) configuram um termo aplicado a uma síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, atribuída a ingestão de alimentos ou água contaminados[4]. Tais doenças podem ser causadas por microrganismos como bactérias, vírus, parasitas e suas toxinas[6]. Os microrganismos indicadores, quando presentes em alimentos, nos fornecem informações sobre a ocorrência de contaminações de origem fecal e sobre DTA's[7]. Os microrganismos indicadores mais comuns são os coliformes totais e coliformes fecais, atualmente conhecidos como coliformes termotolerantes[8].

Neste sentido, este estudo objetivou pesquisar indicadores de contaminação fecal (coliformes totais e termotolerantes) e por material orgânico (*Pseudomonas aeruginosa*) em verduras comercializadas em feiras livres e supermercados da cidade de Caruaru-PE.

METODOLOGIA

Delineamento do estudo

Este estudo possui caráter descritivo e experimental, discriminando quantitativa e qualitativamente os resultados obtidos, coletados a partir da análise bacteriológica de verduras do tipo alface (*Lactuca sativa* L.) coletadas nas principais feiras (Inocoop, Salgado, São francisco, Parque 18 de maio e Cohab I) e supermercados localizados no município de Caruaru-PE. Foram selecionadas verduras com aspecto saudável e integro e excluídas as que apresentassem suas folhas ou outras estruturas com alteração de cor, odor, aspecto e que estivessem no início do estado de putrefação.

Processamento das amostras

As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas contendo baterias de gelo a temperatura de 4°C para o Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico de Alimentos do Centro Universitário Tabosa de Almeida-ASCES/UNITA. A redução da amostra bruta se deu por meio da trituração dos alimentos seguido do seu quarteamento, sendo desprezados 2/4 do peso total, gerando com isso a amostra de laboratório. Em seguida 100 g (50%) de cada amostra foram liquefeitas em 300 mL de solução salina estéril com o uso de um liquidificador industrial (METVISA LOL6) previamente esterilizado por meio de autoclavagem a 121°C/15min. Todos os procedimentos operacionais foram feitos em condições estéreis dentro de uma capela de fluxo laminar. Do caldo obtido das amostras, foram retiradas alíquotas para a realização das análises bacteriológicas.

Avaliação bacteriológica

As avaliações bacteriológicas seguiram os critérios descritos pela RDC nº 331/19 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)[9]. Realizou-se a pesquisa de coliformes totais, termotolerantes e *Pseudomonas aeruginosa*, por meio do método de Tubos Multiplos expresso em NMP (Número Mais Provável)/g e Spread Plate (UFC/g), respectivamente, recomendado pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*[10]. De forma complementar, foi realizada a pesquisa e quantificação de bactérias heterotróficas pelo método de Pour Plate (UFC/g) com o objetivo de avaliar o nível de contaminação dessas amostras.

Pesquisa de Coliformes totais e Termotolerantes

Foi pesquisada a presença de coliformes totais e termotolerantes, utilizando a técnica dos tubos múltiplos recomendada pelo S*tandard Methods for the Examination of Water and Wastewater*[10]. Onde 100g de alface foram homogeneizados em solução salina (NaCl a 0,9 %). Depois, foi inoculado no caldo lactosado (CL) a 35ºC de 24 a 48 horas. Os tubos que apresentaram turbidez e formação de gás dentro dos tubos de *Durham* foram confirmados

no Caldo Lactosado Verde Brilhantes Bile de Boi (CLVBB), e alíquotas retiradas destes e inoculadas em tubos com caldo EC foram incubados em banho-maria a 44,5ºC ± 2ºC por 24 ± 2 horas. Após esse período, os tubos que apresentaram turbidez e produção de gás foram considerados positivos para coliformes termotolerantes. Foi avaliada a presença de *Escherichia coli* através da inoculação no meio Ágar Teague e confirmação nos meios, indol, citrato e ureia.

Pesquisa de Bactérias heterotróficas

Para contagem de bactérias heterotróficas foi utilizada a técnica de cultivo em profundidade (*Pour Plate Method*) com o meio *Plate Count Agar* (PCA). Em cada uma de três placas foi distribuído 1,0 mL e 0,1 mL da amostra diluída em solução alcalina (10^5) e adicionado ao meio PCA fundido, as placas foram homogeneizadas e, após solidificação do meio, incubadas em posição invertida por 24±3 horas de 35 a 37ºC, por fim, a leitura do número de colônias nas placas foi efetuada e calculada a média das unidades formadoras de colônias/mL (UFC/g).

Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*

A pesquisa foi realizada através da técnica *"Spread Plate"* com Ágar Cetrimide como meio de cultura. De modo que um inóculo de 1mL de cada amostra diluída (10^5), foi distribuído na superfície de três placas previamente preparadas com Ágar Cetrimide. Os inóculos foram espalhados pela placa com auxílio de uma alça de *Drigalski*. Após completa absorção da amostra, as placas foram incubadas de forma invertida em estufa, sob temperatura de 35ºC durante 48 horas.

Para identificação da presença de *P. aeruginosa* em ágar cetrimide, as placas que apresentaram crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC), foram submetidas à luz UV. A característica que define o teste presuntivo como positivo, é a presença de pigmento esverdeado fluorescente das colônias sob a luz UV. Para confirmação foi realizado o teste de oxidase das colônias que apresentaram fluorescência.

Análise dos dados

Os dados alcançados foram armazenados em um banco de dados utilizando o aplicativo Excel, sendo expressos por meio dos valores encontrados de Número Mais Provável (NMP) do microrganismo de interesse por grama de alimento (NMP/g), obtidos através da Tabela de *Hoskins*. Trata-se de um estudo com uso de estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na pesquisa foram registrados e expresso pelos valores encontrados de Números Mais Provável (NMP) dos microrganismos de interesse por grama de alimentos (NMP/g) obtido através pela tabela de Hoskins. Foi desenvolvido um índice

(Tabela 1) para classificar o grau de contaminação das amostras analisadas, tendo base dos valores de NMP/g, para que pudesse estabelecer o índice de contaminação pelo grupo Coliformes.

Índice de contaminação	Classificação	NMP/g
0	Negativo	< 1,8
1	Baixo	1,8 a 10
2	Intermediário	11 a 90
3	Alto	91 a 900
4	Muito Alto	> 900

Tabela 1. Índice de contaminação microbiana expresso em NMP/g.

Das 24 amostras analisadas provenientes de estabelecimentos comerciais, 91,7% apresentaram presença de coliformes totais e 4,2% a presença de coliformes termotolerantes. Já nas Feiras livres, foram analisados um total de 18 amostras onde, 100% das amostras apresentaram presença de coliformes totais e 50% a presença das termotolerantes.

As Figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, a distribuição dos resultados:
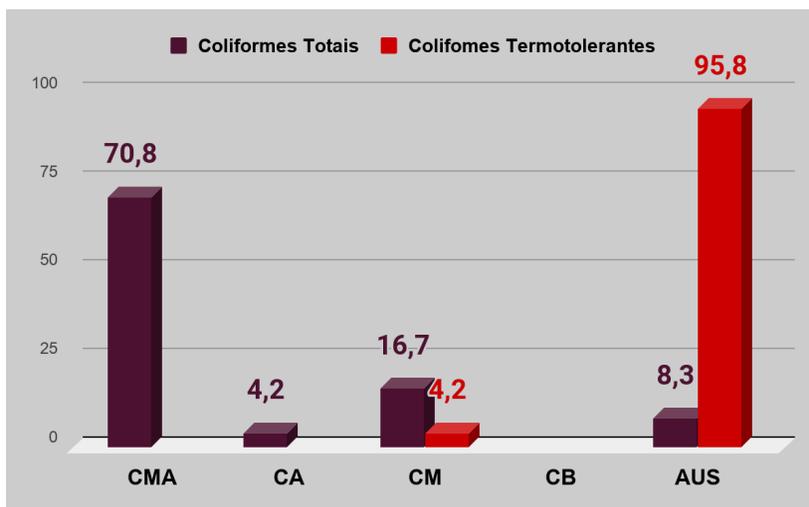
Figura 1. Gráfico em Colunas 3D. Resultados de amostras (%) provenientes de Supermercados, com presença de coliformes totais e termotolerantes. Aus (Ausência - Negativo); CB(Concentração Baixa); CM (Concentração Mediana - Intermediária); CA (Concentração Alta); CMA (Concentração Muito Alta). Classificação de acordo com a Tabela 1.
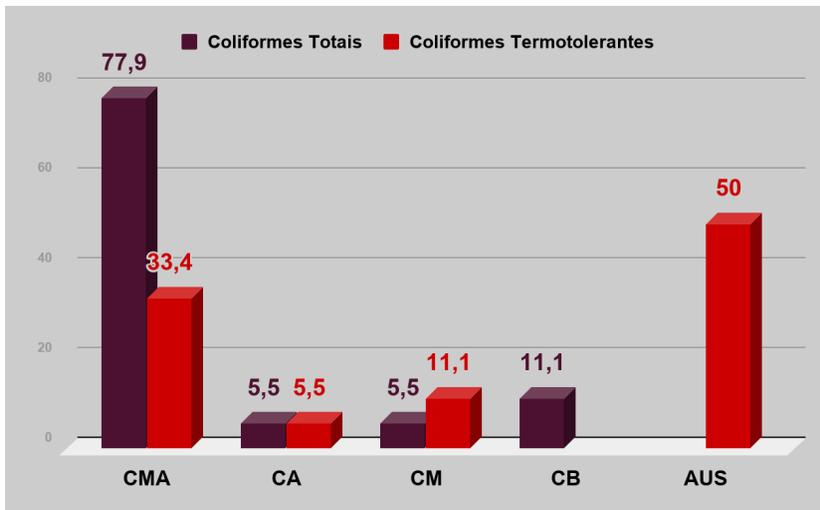
Figura 2. Gráfico em Colunas 3D. Resultados de amostras (%) provenientes de Feiras Livres, positivas para Coliformes totais e termotolerantes. Aus (Ausência - Negativo); CB(Concentração Baixa); CM (Concentração Mediana - Intermediária); CA (Concentração Alta); CMA (Concentração Muito Alta). Classificação de acordo com a Tabela 1.

A presença de bactérias heterotróficas, tanto em supermercados quanto em feiras livres, deu-se em todas as amostras, ou seja, 100% das amostras. Como descrito na Tabela 2:

Bactérias Heterotróficas		
	% de amostras positivas	**Média em UFC/g**
Supermercados	100%	$2,82 \pm 2,8 \times 10^{7}$
Feiras Livres	100%	$2,8 \pm 1,2 \times 10^{7}$

Tabela 2. Resultado de amostras de supermercados e feiras livres, positivas para bactérias heterotróficas.

A presença da *Pseudomonas aeruginosa* está exposto na Tabela 3:

Pseudomonas aeruginosa		
	% das amostras positivas	**Média em UFC/g**
Supermercado	21,74 %	$2,9 \pm 3,3 \times 10^{6}$
Feiras Livres	55,55 %	$1,23 \pm 1,17 \times 10^{6}$

Tabela 3. Resultados de amostras de supermercados e feiras livres com presença de *P. aeruginosa*.

Diante da RDC- 331/19 da ANVISA, apenas os alimentos que contenham a presença de *Salmonella spp.* e *Escherichia coli* a uma concentração > 1000/ NMP/g seriam reprovadas (Figura 3). Esse parâmetro reprovou, aproximadamente, 40% das amostras provenientes de feiras livres e aprovou todas as demais amostras, tanto de feiras quanto de supermercados, mesmo estas contendo altas cargas microbiológicas de outros microrganismos. Além disso, na lei também não é mencionada a presença de microrganismo que indicam contaminação por condições higiênicas precárias, como é o caso da *Pseudomonas aeruginosa* que mesmo sendo patogênica, é oportunista e indica contaminação do produto por material orgânico em decomposição. Também pode-se citar os coliformes totais cuja presença pode indicar que o produto esteve em contato com material fecal.

2. HORTALIÇAS, RAÍZES, TUBÉRCULOS, FUNGOS COMESTÍVEIS E DERIVADOS					
Categorias Específicas	Micro-organismo/Toxina/Metabólito	n	c	m	M
a) "In natura", inteiros, selecionados ou não	*Salmonella/25g*	5	0	Aus	-
	Escherichia coli/g	5	2	102	103

Figura 3. Parte da RDC331/19 e IN 60 que diz respeito à Hortaliças. FONTE: portal.anvisa.gov.br

CONCLUSÕES

Com os resultados encontrados, conclui-se que parte dos alimentos que foram analisados podem ser classificados como uma fonte de risco à saúde pública, visto que foram detectados microrganismos patogênicos e oportunistas que comprovam desvios na qualidade dessas amostras, sugestivas de más condições higiênico-sanitárias, as quais o produto pode ter sido exposto entre a etapa de processamento até a comercialização. Fica evidente, também, que a fiscalização assim como a lei, deveriam passar por mudanças, agindo com mais cautela e rigor. Ainda vale ressaltar a importância do controle de qualidade, assim como embalagens que protejam o alimento de contato com possíveis contaminantes após a produção, objetivando a diminuição da contaminação do produto final, fornecendo aos consumidores produtos com melhores condições.

REFERÊNCIAS

1- Golin A, Coden MAS, Rolim RI, et al. Qualidade higiênico-sanitária e o perfil de feirantes e usuários das feiras-livres de Santa Maria-RS. Disciplinarum Sciential Saúde. 2016, 17(3):423-434.

2- Silveira VC, Oliveira ES, Mariani MA, et al. AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DAS FEIRAS LIVRES E A FORMA DE COMERCIALIZAÇÃO ADOTADA PELOS FEIRANTES NA CIDADE DE NOVA ANDRADINA–MS. Gestão, Desenvolvimento e Inovação. 2017, 1(1):137-142.

3- Araujo AM, Ribeiro EM. Feiras, feirantes e abastecimento: uma revisão da bibliografia brasileira sobre comercialização nas feiras livres. Estudos Sociedade e Agricultura. 2018, 26(3):561-583.

4- Sirtoli DB, Comarella L. O papel da vigilância sanitária na prevenção das doenças transmitidas por alimentos (DTA). Revista Saúde e Desenvolvimento. 2018, 12(10):197-209.

5- Rosa ML, Andrade RM. ANÁLISE DE CONTROLE DE QUALIDADE DOS ALIMENTOS OFERECIDOS EM UMA UNIDADE DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO NO MUNICÍPIO DE FEIRA DE SANTANA. Revista de Inovação, Tecnologia e Ciências. 2016, 2(2):159-164.

6- Magnoni D, Tardioli M, Zagato M, et al. Segurança alimentar e informação nutricional podem reduzir a intoxicação alimentar na alimentação fora do lar. Rev Bras Nutr Clin. 2016, 31(2):91-96.

7- Teixeira BK, Nespolo CR, Pinheiro FC, et al. Microrganismos indicadores de condições higiênico-sanitárias em couve folhosa na região da Fronteira Oeste, RS, Brasil. Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão. 2016, 7(2):159-164.

8- Ponath FS, Valiatti TB, Sobral FDOS, et al. Avaliação da higienização das mãos de manipuladores de alimentos do Município de Ji-Paraná, Estado de Rondônia, Brasil. Revista Pan-Amazônica de Saúde. 2016, 7(1):63-72.

9- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução n° 331, de 23 de dezembro de 2019. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. 26 de Dez de 2019

10- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA); AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATON (AWWA); WATER ENVIRONMENT ASSOCIATION (WEF). Standard methods for the examination of water & wastewater. 21 ed. Washington, 2012.

CAPÍTULO 6

EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A AGENTES BIOLÓGICOS– CARACTERIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AMBIENTAL E FOMITES NA INDÚSTRIA DE RESÍDUOS

Data de aceite: 19/01/2021
Data de submissão: 15/12/2020

Marta Vasconcelos Pinto
Politécnico de Coimbra, ESTeSC, DCBL
Coimbra, Coimbra, Portugal
CISAS, Centro de Investigação em Sistemas Agroalimentares e Sustentabilidade, Instituto Politécnico de Viana do Castelo
Viana do Castelo, Portugal

Manuela Vaz-Velho
CISAS, Centro de Investigação em Sistemas Agroalimentares e Sustentabilidade, Instituto Politécnico de Viana do Castelo
Viana do Castelo, Portugal
Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Viana do Castelo
Viana do Castelo, Portugal

Joana Santos
CISAS, Centro de Investigação em Sistemas Agroalimentares e Sustentabilidade, Instituto Politécnico de Viana do Castelo
Viana do Castelo, Portugal
Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Viana do Castelo
Viana do Castelo, Portugal

RESUMO: A dualidade trabalho e saúde são conceitos intimamente relacionados com o ser humano, tanto numa na perspetiva tradicional, onde a prevenção de doenças no local de trabalho, saúde ocupacional e o modelo de saúde preventiva assumem particular relevância como na vertente social, onde a abordagem preventiva e as atitudes individuais sobre saúde ocupacional alcançam particular destaque. Neste contexto, torna-se imperioso o prévio conhecimento dos riscos a que os trabalhadores se encontram expostos, encetando a ação preventiva na correta identificação e quantificação desses riscos. Constituiu objetivo deste trabalho conhecer o risco de exposição ocupacional a agentes biológicos (bactérias e fungos) na indústria de triagem de resíduos e aterro sanitário. A componente experimental do estudo compreendeu recolhas ambientais e de superfície nas torneiras e maçanetas das instalações sanitárias, maçanetas de cacifos, maçanetas dos serviços administrativos, interior de máscaras de proteção respiratória e mãos dos operadores. Como resultado das 56 amostras de ar e 51 amostras de superfície e mãos de operadores, foram efetuadas 343 identificações de bactérias e 273 identificações de fungos. Os resultados decorrentes desta investigação reforçam a necessidade da existência de planos de formação específicos relacionados com a exposição ocupacional a agentes biológicos adotados paralelamente com medidas organizacionais e de engenharia, bem como medidas de proteção coletiva reforçadas pela implementação de medidas de índole individual.

PALAVRAS-CHAVE: Agentes biológicos; bioaerossóis, bactérias, fungos.

OCCUPATIONAL EXPOSURE TO BIOLOGICAL AGENTS - CHARACTERIZATION OF ENVIRONMENTAL EXPOSURE AND FOMITES IN THE WASTE INDUSTRY

ABSTRACT: Work and health are closely human-related concepts that form a duality both in a traditional perspective, in which disease prevention in the workplace, occupational health and the preventive health model take on particular relevance, and in the social aspect, in which the preventive approach and individual attitudes on occupational health have been the focus of special attention. In this context, the previous knowledge of the risks to which workers are exposed is of crucial importance, and preventive actions for the accurate identification and quantification of those risks should be initiated. This study aimed to assess the occupational risk of exposure to biological agents (viable bacteria and fungi) in the waste industry. The experimental component in this study comprised environmental and surface collections (water tap's and doorknob in the bathroom, lockers' knobs, administrative services knobs, inside of protective breathing masks and operator's hands). As a result of the 56 air samples and 51 surface samples, 343 bacterial and 273 mould identifications were performed. The results from this study reinforce the need for the existence of specific training plans related to occupational exposure to biological agents adopted with organizational, engineering and collective protection measures strengthened by the implementation of individual protective measures.
KEYWORDS: Biological agentes; bioaerosols; bactéria; fungi.

INTRODUÇÃO

O ar representa um papel crucial na disseminação de agentes biológicos em contexto ocupacional. O estudo dos agentes biológicos transmitidos por via aérea sofreu uma significativa expansão relacionando a transmissão de doenças por via respiratória em humanos (Stetzenbach, 2002).

Os principais responsáveis pela mobilidade dos microrganismos por via aérea são os apelidados bioaerossóis. A *American Conference of Government Industrial Hygienists* (ACGIH) define bioaerossóis como partículas aéreas, grandes moléculas ou compostos voláteis que contêm seres vivos ou que foram libertados por estes. Os bioaerossóis são micro sistemas que possuem atividade biológica. Podem ser constituídos por poeiras, pólen, água e vários organismos vivos ou mortos, tais como fungos, esporos, metabolitos fúngicos, bactérias, endotoxinas, vírus, protozoários ou artrópodes, como, por exemplo, os ácaros (Dutkiewicz, Cisak, Sroka, Wójcik-fatla, & Zając, 2011; Walser et al., 2015). Habitualmente, devido à sua reduzida dimensão, encontram-se suspensos no ar, tanto no interior dos edifícios, como no exterior. O diâmetro das partículas varia entre os 0,02μm e os 100μm (Maier, Pepper, & Gerba, 2009).

Apesar do interesse sob o ponto de vista da higiene industrial surgir associado à exposição a bioaerossóis, a avaliação de outras formas de exposição e consequente contaminação, nomeadamente o contacto com superfícies e operadores tem vindo a ser reforçada (Anupam, Kansal, Asthana, Pandey, & Madan, 2011; Boone & Gerba, 2005;

Julian, Leckie, & Boehm, 2010; Kramer, Schwebke, & Kampf, 2006; D.-U. Park, Ryu, Kim, & Yoon, 2011; Tacconelli, 2011; C Viegas, Malta-Vacas, Sabino, Viegas, & Veríssimo, 2014; Carla Viegas et al., 2014). Um dos mais importantes modos de transmissão microbiana com respeito a doença é a transmissão através de superfícies. Entre os tipos de superfícies que são mais frequentemente envolvidas na transmissão microbiana encontram-se a pele humana e as superfícies ou *fomites*. *Fomites* são superfícies porosas e não porosas ou objetos que podem ser contaminados com microrganismos patogénicos, servindo de veículos de transmissão de doença (Boone & Gerba, 2007).

As *fomites* são contaminadas por variados agentes biológicos por meio de contacto direto com fontes de agentes infeciosos, por contacto com bioaerossóis ou por deposição destes. Uma vez contaminada a superfície, a transferência dos agentes infeciosos pode facilmente ocorrer entre objetos inanimados e animados (e vice-versa) ou entre *fomites* distintas que tenham contactado entre si (Boone & Gerba, 2007). Conceitualmente, o processo de transferência de um agente patogénico através de *fomites* encontra-se circunscrito em três etapas: a contaminação da superfície (inoculação), a transferência para as mãos e destas para as membranas mucosas (Wan, 2010).

Diversos estudos incidem sobre a temática da contaminação ambiental por bactérias, fungos e respetivos metabolitos, procurando estabelecer uma relação entre a exposição ocupacional e o aparecimento de distintos sintomas entre os colaboradores (Douwes, Eduard, & Thorne, 2008; Douwes, Thorne, Pearce, & Heederik, 2003; Dutkiewicz, 1997; Porta, Milani, Lazzarino, Perucci, & Forastiere, 2009). A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece 150 unidades formadoras de colónias (UFC) por metro cúbico (m^3) de ar como o limiar a partir do qual se desenvolvem efeitos adversos na saúde, especialmente se forem encontradas espécies patogénicas, considerando inaceitável a proliferação de determinadas espécies em ambiente interior (Goyer, Lavoie, Lazure, & Marchand, 2001).

Novas atividades industriais emergiram nos últimos anos onde a exposição a agentes biológicos é relevante. Tradicionalmente, os maiores riscos verificam-se nas atividades agrícolas, atividades ligadas à prestação de cuidados de saúde e laboratórios, e atividades relacionadas com o tratamento de resíduos.

A proteção dos profissionais ligados à gestão de resíduos depende do conhecimento prévio dos riscos a que se encontram expostos e da identificação e quantificação desses riscos (Vasconcelos Pinto et al., 2015). Desta forma, a avaliação de riscos permite uma correta formulação e aplicação de medidas de prevenção e proteção nos locais de trabalho, alvitrando a existência de locais de trabalho mais seguros e saudáveis.

Este estudo, caracterizado por uma forte componente de trabalho de campo e laboratorial, envolveu uma equipa multidisciplinar da qual fizeram parte elementos da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra – Instituto Politécnico de Coimbra e da Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viana do Castelo – Instituto Politécnico de Viana do Castelo.

Este trabalho de investigação científica tem por objetivo estudar a exposição ocupacional a agentes biológicos (bactérias e fungos viáveis) na indústria de triagem de resíduos e aterro sanitário.

MÉTODOS

As recolhas ambientais e de superfície foram efetuadas num sistema multimunicipal de triagem, recolha, valorização e tratamento de resíduos sólidos urbanos, prestando serviço a uma população de cerca de 114.000 habitantes pertencentes a 10 municípios localizados na região interior norte do País. Recebe anualmente cerca de 1800 toneladas de resíduos valorizáveis (embalagens e cartão) e 36 000 toneladas de RU, contando com a colaboração de 37 trabalhadores distribuídos pelo sector administrativo, transporte, triagem e deposição final de resíduos. Destes, 30 estão potencialmente expostos a agentes biológicos. Em matéria de organização dos serviços de segurança e saúde no trabalho, a empresa adotou a modalidade de serviços externos com organização em separado para todas as suas atividades. Em termos de medidas de prevenção e proteção dos colaboradores, face à exposição a agentes biológicos, existe programa de vacinação específico, tendo sido igualmente implementada uma lavandaria interna e meios de desinfeção das mãos.

AMOSTRAGEM

Ar - Bioaerossóis

Para a recolha de amostras ambientais foi utilizado o impactado de ar *Sampl'air Lite*, AES *Chemunex*, França., As recolhas foram efetuadas a uma altura de 1 m e em duplicado em meio de amostragem específico para bactérias (Agar Nutritivo - AN) e fungos (Malte Agar – MA, suplementado com cloranfenicol 0,05%). As amostras de ar foram recolhidas em 3 zonas distintas:

- Zona Crítica (ZC), onde se processa a triagem de resíduos valorizáveis (papel e embalagens) e deposição final de resíduos (aterro sanitário). Os colaboradores desempenham funções em turnos de 8 horas diárias utilizando máscaras de proteção respiratória. Neste ponto de colheita foram efetuadas 31 recolhas ambientais (6 na triagem de papel, 11 na triagem de embalagens, 14 em aterro sanitário).
- Zona Não Crítica (ZNC) situada nos serviços administrativos, onde os colaboradores não se encontram diretamente expostos ao processo de valorização e deposição final de resíduos. As instalações encontram-se situadas a noroeste das células de aterro, dispondo de sistemas de ventilação natural e sistemas de climatização (aquecimento). Neste ponto foram recolhidas 13 recolhas ambientais.
- Ponto de Controlo (PC) situado no exterior dos serviços administrativos. Neste ponto foram recolhidas 14 recolhas ambientais, tendo sido consideradas 13

para as contagens totais de fungos devido à invasão dos meios de cultura.

Os volumes de ar recolhidos foram ajustados de acordo com estimativa da contaminação biológica existente em cada ponto de amostragem. Na ZC procedeu-se à recolha de 50 L, enquanto que na ZNC e PC o volume de ar recolhido foi de 100 L, com um caudal de 20 L / min. A calibração do equipamento de amostragem foi realizada por uma organização credenciada externa, de acordo com a ISO 17025: 2005. O plano de amostragem foi realizado de acordo com as recomendações da A*merican Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) (Macher, J., 1999).

A concentração da microflora ambiental encontra-se expressa em UFC por volume de ar recolhido (m^3).

Superfície

Foram efetuadas recolhas de superfície através de esfregaço em várias superfícies de contacto regular e diário com os operadores de resíduos: maçanetas dos cacifos (n=2); maçanetas de instalações sanitárias/balneários (maçanetas IS) (n=7); maçanetas de serviços administrativos (maçanetas SA) (n=10), torneiras das instalações sanitárias/ balneários (Torneira IS) (n=12) e interior das máscaras de proteção (n=8). Foram igualmente efetuadas recolhas nas mãos dos operadores de resíduos (n= 12) após lavagem e secagem das mãos de acordo com as respetivas práticas individuais.

A concentração de microrganismos obtidos encontra-se expressa em UFC por área de superfície analisada (cm^2).

Análise

A componente experimental e analítica foi integralmente desenvolvida na Unidade de Microbiologia Aplicada da Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viana do Castelo, laboratório acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), com o certificado de acreditação nº L0359.

Para recolhas de superfície e contaminação em mãos dos operadores de resíduos, procedeu-se à inoculação de 1 ml do meio de transporte em placas com NA e MA (suplementado com cloranfenicol 0,05%).

Todas as placas de Petri (ar, superfícies e operadores) foram incubadas aerobicamente a 37ºC durante 48 h e a 25ºC durante 3-5 dias para bactérias fungos, respetivamente. Para as amostras ambientais e de acordo com a amostra recolhida e o método selecionado, o limite de deteção (LD) (20 ufc / m^3) e o limite máximo de quantificação (LQ) foram considerados (25180 ufc / m^3).

Para a recolhas de superfície e mãos de operadores procedeu-se à contagem de microrganismos a 30ºC (ISO 4833-1: 2013) e *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2: 2004). Para as recolhas das mãos dos operadores, recorreu-se à pesquisa de *Escherichia coli* (NP-2308: 1986), coliformes a 30ºC (NP-2164: 1983) e *Staphylococcus aureus* (NP -2260: 1986).

As identificações foram realizadas segundo os procedimentos internos do

laboratório, elaborados de acordo com os critérios para classificação dos microrganismos. Após a contagem indiferenciada de microrganismos, foi efetuada a contagem de cada tipo de colónia distinta observada na placa e repicada para os meios apropriados. As culturas puras inoculadas foram sujeitas a identificação por observação morfológica e testes bioquímicos, de acordo com o recomendado pelo manual *Bergey 's* (Krieg, Bergey, Holt, 1984; Sneath PHA, Mair N, Sharpe ME, 1986; Williams ST, Sharpe ME, 1989). As colónias de bactérias isoladas foram identificadas utilizando as galerias de identificação API 50 CH (Biomérieux, Marcy l´Etoile, France), API 50CHB/E (Biomérieux, Marcy l´Etoile, France), API Coryne (Biomérieux, Marcy l´Etoile, France), API 20 Strep (Biomérieux, Marcy l´Etoile, France), BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID kit (BD Diagnostics Systems Europe, Sparks, MD), e BBL Crystal Gram-Positive ID kit (BD Diagnostics Systems Europe, Sparks, MD). As colónias de leveduras foram repicadas para uma placa com meio de cultura cromogénico BBL CHROMagar Candida (254093, BD Diagnostics Sistems Europe), permitindo despistar a existência de estirpes de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Foram ainda utilizadas galerias de identificação ID 32C (32200, Biomérieux) para a identificação final dos géneros e espécies de leveduras. Após o isolamento em MA, procedeu-se à identificação de fungos filamentosos de acordo com a sua morfologia macroscópica e observação microscópica do micélio.

Análise estatística

Para a análise estatística utilizou-se o IBM SPSS versão 19.0 para Windows. Tendo em conta o tamanho das amostras e considerando a distribuição (não normal e variâncias não homogéneas) entre as diferentes zonas das variáveis em estudo, utilizou-se o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*, seguido de comparações múltiplas aplicando uma ANOVA *one-way* e usando o teste LSD de *Fisher*.

RESULTADOS

Das 56 amostras de ar recolhidas foram efetuadas 262 identificações de bactérias e 188 identificações de fungos.

As médias das contagens totais de fungos e bactérias nas operações de triagem de papel, aterro sanitário e triagem de embalagens (ZC) são sempre superiores às contagens obtidas no ponto de controlo (PC) e zona não crítica (ZNC) (Tabela 1). Os níveis de exposição ocupacional a bactérias e fungos viáveis mais elevados foram verificados na triagem de papel, com contagens médias de 595 ufc/m^3 e 19558 ufc/m^3, respetivamente (Tabela 1 e Tabela 2). A ZNC apresenta contagens de bactérias e fungos viáveis superiores às verificadas no PC.

O teste de *Kruskal-Wallis* demonstrou a existência de diferenças significativas nos vários pontos de colheita (*p-value* <0,05), com exceção na ZC – Aterro (p-*value* =0,104), para as contagens de fungos. As comparações múltiplas entre os vários pontos

de amostragem utilizando uma ANOVA one-way aos *ranks* do total de bactérias e fungos seguido do teste de LSD de Fisher revelou a existência de diferenças significativas (*p-value* <0,05), excetuando a ZNC e PC (Triagem de papel e embalagens – ZC).

Observa-se a predominância de bactérias Gram (+), nomeadamente pertencentes aos géneros *Staphylococcus* (coagulase negativa) e *Bacillus*, embora com ligeiras variações em termos de importância em cada ponto de colheita. Analisando comparativamente as espécies bacterianas identificadas nos diversos pontos de colheita, verifica-se a existência de espécies distintas entre os quatro pontos de colheita e a amostra de referência (ponto de controlo no exterior), sendo ainda possível verificar a existência de bactérias incluídas no grupo 2 da classificação dos agentes biológicos (embora com expressão pouco significativa - 0,07% a 1,22% de espécies classificadas) (Portaria 405/98, 1998; Portaria 1036/98, 1998).

Pontos de Colheita	Gram	Género	Espécie	Classificação	Total (UFC/ m³)
Zona Crítica (Aterro)	(-)	*Acinetobacter* spp.	*Acinetobacter lwoffi*	NC	180
	(-)	*Enterobacter* spp.	*Enterobacter cloacae*	2	20
	(+)	*Staphylococcus* coagulase negativa	*Staphylococcus* coagulase negativa	NC	221
	(+)	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp.	NC	65
			Bacillus cereus	NC	37
			Bacillus pumilus	NC	50
			Bacillus megaterium	NC	40
			Bacillus mycoides	NC	20
	(+)	*Cellulomonas* spp. / *Microbacterium* spp.	*Cellulomonas* spp. / *Microbacterium* spp.	NC	60
	(+)	*Corynebacterium* spp.	*Corynebacterium* spp.	2	40
			Corynebacterium jeikeium	2	40
			Corynebacterium aquaticum	2	20
			Corynebacterium diphtheriae	2	20
	(+)	*Micrococcus* spp.	*Micrococcus* spp.	NC	50
	(+)	*Brevibacterium* spp.	*Brevibacterium* spp.	NC	60
	(+)	*Geobacillus* spp.	*Geobacillus thermoglucosidasius*	NC	40
Contagem média do total de bactérias = 2.8×10^2			Mín = 60	Máx = 2.8×10^2	

Pontos de Colheita	Gram	Género	Espécie	Classificação	Total (UFC/ m³)
Zona Crítica (Triagem de papel)	(-)	*Enterobacter* spp.	*Enterobacter aerogenes*	2	150
			Enterobacter spp.	2	20
	(-)	*Stenotrophomonas* spp.	*Stenotrophomonas maltophilia*	NC	50
	(-)	*Pantoea* spp.	*Pantoea agglomerans*	NC	50
	(-)	*Acinetobacter* spp.	*Acinetobacter lwoffi*	NC	40
	(+)	*Staphylococcus* coagulase negativa	*Staphylococcus* coagulase negativa	NC	106
	(+)	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp.	NC	45
			Bacillus subtilis	NC	340
			Bacillus cereus	NC	53
			Bacillus sphaericus	NC	20
	(+)	*Micrococcus* spp.	*Micrococcus* spp.	NC	75
	(+)	*Rhodococcus* spp.	*Rhodococcus* spp.	NC	20
Contagem média do total de bactérias = 5.9 x 10^2			Mín = 3 x 10^2	Máx =1.2x 10^3	
Zona Crítica (Triagem de Embalagens)	(-)	*Pantoea* spp.	*Pantoea agglomerans*	NC	220
	(-)	*Acinetobacter* spp.	*Acinetobacter lwoffi*	NC	120
	(-)	*Enterobacter* spp.	*Enterobacter* spp.	2	40
			Enterobacter cloacae	2	20
	(-)	*Pseudomonas* spp.	Pseudomonas aeruginosa	2	20
	(-)	*Klebsiella* spp.	Klebsiella oxytoca	2	40
	(+)	*Staphylococcus* coagulase negativa	*Staphylococcus* coagulase negativa	NC	119
	(+)	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp.	NC	61
			Bacillus cereus	NC	23
			Bacillus megaterium	NC	80
			Bacillus subtilis	NC	60
			Bacillus circulans	NC	40
			Brevibacillus non reactive	NC	20
	(+)	*Micrococcus* spp.	*Micrococcus* spp.	NC	80
	(+)	*Corynebacterium* spp.	*Corynebacterium afermentans*	2	100
			Corynebacterium propinquum	2	40
			Corynebacterium pseudogenitalium	2	20
	(+)	*Cellulomonas* spp. / *Microbacterium* spp.	*Cellulomonas* spp. / *Microbacterium* spp.	NC	40
	(+)	*Arthrobacter* spp.	*Cellulosimicrobium cellulans*	NC	20
			Arthrobacter spp.	NC	20
	(+)	*Leifsonia* spp.	*Leifsonia aquaticum*	NC	40
	(+)	*Kytococcus* spp.	*Kytococcus sedentarius*	NC	20
Contagem média do total de bactérias = 4.9 x 10^2			Mín = 1.8 x 10^2	Máx =9.2x 10^3	

Pontos de Colheita	Gram	Género	Espécie	Classificação	Total (UFC/ m^3)
Ponto de Controlo	(-)	*Pseudomonas* spp.	*Brevundimonas vesiculares*	NC	60
	(+)	*Staphylococcus* coagulase negativa	*Staphylococcus* coagulase negativa	NC	23
	(+)	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp.	NC	13
			Bacillus cereus	NC	10
	(+)	*Gardnerella* spp.	Gardnerella vaginalis	2	10
	(+)	*Cellulomonas* spp. / *Microbacterium* spp.	*Cellulomonas* spp. / *Microbacterium* spp.	NC	10
Contagem média do total de bactérias = 34			Mín = 0	Máx =90	
Zona não crítica	(-)	*Enterobacter* spp.	*Enterobacter gergoviae*	2	20
	(-)	*Acinetobacter* spp.	*Acinetobacter lwoffi*	NC	20
	(+)	*Staphylococcus* coagulase negativa	*Staphylococcus* coagulase negativa	NC	35
	(+)	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp.	NC	11
			Bacillus cereus	NC	10
	(+)	*Staphylococcus* coagulase positiva	*Staphylococcus* aureus	2	40
			Staphylococcus coagulase positiva	NC	110
	(+)	*Micrococcus* spp.	*Micrococcus* spp.	NC	70
			Micrococcus roseus	NC	10
	(+)	*Lactococcus* spp.	*Lactococcus lactis* spp. *Cremoris*	NC	40
	(+)	*Aerococcus* spp.	*Aerococcus urinae*	NC	40
	(+)	*Corynebacterium* spp.	*Corynebacterium* spp.	2	10
			Corynebacterium pseudogenitalium	2	10
	(+)	*Cellulomonas* spp. / *Microbacterium* spp.	*Cellulomonas* spp. / *Microbacterium* spp.	NC	10
Contagem média do total de bactérias = 1.2×10^2			Mín = 40	Máx = 2.5×10^2	

Tabela 1 Média das Contagens Totais (ufc/ m^3) de cada espécie bacteriana identificada por ponto de colheita e respetiva classificação

Relativamente à caracterização da microflora fúngica, nos três pontos de colheita referentes à ZC o género maioritário identificado foi *Penicillium*, representando entre 79,43 % e 99,69% da microflora fúngica destes postos de trabalho (Tabela 2). A ZNC apresenta igualmente o predomínio de espécies pertencentes ao género *Penicillium*, seguido de *Cladosporium*, com 24,55% dos fungos identificados. Verifica-se uma variedade significativa de espécies fúngicas no PC (19 espécies), seguido do aterro sanitário (15 espécies), sendo as espécies identificadas pertencentes aos géneros *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus niger* comuns a todos os pontos de colheita. As operações dedicadas ao aterro sanitário e

triagem de papel não apresentam contaminação por fungos pertencentes ao grupo 2.

Pontos de Colheita	Género	Espécie	Classificação	Total
Zona Crítica (Aterro)	*Penicillium* spp.	*Penicillium* spp.	NC	830
	Cladosporium spp.	*Cladosporium* spp.	NC	215
	Candida spp.	*Candida famata*	NC	48
		Candida spp.	NC	20
		Candida zeylanoides	NC	40
	Aspergillus spp.	*Aspergillus flavus*	NC	40
		Aspergillus niger	NC	34
	Cryptococcus spp.	*Cryptococcus albidus*	NC	40
		Cryptococcus laurentii	NC	27
	Ulocladium spp.	*Ulocladium* spp.	NC	20
	Rhodotorula spp.	*Rhodotorula* spp.	NC	20
	Alternaria spp.	*Alternaria* spp.	NC	20
	Streptomyces spp.	*Streptomyces* spp.	NC	20
	Saccharomyces spp.	*Saccharomyces* spp.	NC	20
	Mucor spp.	*Mucor* spp.	NC	20
Contagem média do total de fungos = 8.2×10^2		Mín = 1.2×10^2	Máx =1.1×10^4	
Zona Crítica (Triagem de Papel)	*Penicillium* spp.	*Penicillium* spp.	NC	18750
	Aspergillus spp.	*Aspergillus* niger	NC	45
	Cladosporium spp.	*Cladosporium* spp.	NC	80
Contagem média do total de fungos = 1.9×10^4		Mín = 7.7×10^3	Máx =2.6×10^4	
Zona Crítica (Triagem de Embalagens)	*Penicillium* spp.	*Penicillium* spp.	NC	17513
	Cladosporium spp.	*Cladosporium* spp.	NC	164
	Aspergillus spp.	*Aspergillus* niger	NC	23
	Candida spp.	*Candida boidinii*	NC	20
		Candida famata	NC	50
		Candida spp.	NC	40
	Cryptococcus spp.	*Cryptococcus laurentii*	NC	40
	Trichophyton spp.	*Trichophyton equinum*	2	20
	Rhodotorula spp.	*Rhodotorula* spp.	NC	20
Contagem média do total de fungos = 1.8×10^4		Mín = 1.1×10^3	Máx =1.8×10^4	

Pontos de Colheita	Género	Espécie	Classificação	Total
Ponto de Controlo	*Cladosporium* spp.	*Cladosporium herbarum*	NC	10
		Cladosporium spp.	NC	253
	Penicillium spp.	*Penicillium* spp.	NC	68
	Rhodotorula spp.	*Rhodotorula glutinis*	NC	10
		Rhodotorula spp.	NC	25
	Aspergillus spp.	*Aspergillus flavus*	NC	70
		Aspergillus niger	NC	20
	Streptomyces spp.	*Streptomyces* spp.	NC	50
	Cryptococcus spp.	*Cryptococcus laurentii*	NC	30
	Trichophyton spp.	*Trichophyton equinum*	2	25
	Saccharomyces spp.	*Saccharomyces* spp.	NC	20
	Ulocladium spp.	*Ulocladium* spp.	NC	20
	Candida spp.	*Candida famata*	NC	10
		Candida spp.	NC	10
	Botrytis spp.	*Botrytis cinerea*	NC	20
	Microsporum spp.	*Microsporum equinum*	2	10
		Microsporum spp.	2	10
	Curularia spp.	*Curularia* spp.	NC	10
	Tricoderma spp.	*Tricoderma* spp.	NC	10
Contagem média do total de fungos = 4.2×10^2		Mín = 50	Máx =1.3×10^3	
Zona não crítica	*Penicillium* spp.	*Penicillium* spp.	NC	265
	Cladosporium spp.	*Cladosporium* spp.	NC	103
	Aspergillus spp.	*Aspergillus flavus*	NC	20
		Aspergillus niger	NC	43
		Aspergillus terreus	NC	120
	Cryptococcus spp.	*Cryptococcus humicola*	NC	40
	Trichophyton spp.	*Trichophyton* spp.	2	20
	Rhodotorula spp.	*Rhodotorula* spp.	NC	10
	Ulocladium spp.	*Ulocladium* spp.	NC	10
	Candida spp.	*Candida famata*	NC	10
Contagem média do total de fungos = 4.4×10^2		Mín = 50	Máx =1.7×10^3	

Tabela 2 - Média das Contagens Totais (ufc/m^3) de cada espécie fúngica identificada por ponto de colheita e respetiva classificação

No que diz respeito às colheitas de superfície, foram identificadas as espécies *Enterobacter aerogenes*, *E. sakazakii* e *E. cloacae* pertencentes ao grupo 2 nos manipuladores e nas torneiras IS. No interior das máscaras foram ainda detetados os géneros *Corynebacterium* e *Streptococcus*, géneros predominantes da flora nasal e oral e também classificados no grupo 2.

Pontos de Colheita	Gram	Género	Espécie	Classificação	Total
Manipulador	(-)	*Rahnella* spp.	*Rahnella aquatilis*	NC	1100
	(-)	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	NC	425
	(-)	*Pseudomonas* spp.	*Pseudomonas putida*	NC	400
	(-)	*Enterobacter* spp.	*Enterobacter sakazakii*	2	380
			Enterobacter spp.	2	250
			Enterobacter aerogenes	2	130
	(-)	*Acinetobacter* spp.	*Acinetobacter baumannii*	NC	200
	(+)	*Staphylococcus* coagulase negativa	*Staphylococcus* coagulase negativa	NC	6812
	(+)	*Micrococcus* spp.	*Micrococcus* spp.	NC	1300
	(+)	*Aerococcus* spp.	*Aerococcus viridans*	NC	500
	(+)	*Leuconostoc* spp.	*Leuconostoc* spp.	NC	375
	(+)	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp.	NC	267
			Bacillus cereus	NC	130
	(+)	*Staphylococcus* coagulase positiva	*Staphylococcus* coagulase positiva	NC	200
Contagem média do total de bactérias = 4.1 x 10^3			Mín = 100	Máx =3.8x 10^4	
Cacifo	(+)	*Bacillus* spp.	*Bacillus cereus*	NC	30000
Contagem média do total de bactérias = 3 x 10^4			Mín = 3 x 10^4	Máx =3 x 10^4	
Interior Máscara	(-)	*Escherichia* spp.	*Escherichia vulneris*	NC	100
	(+)	*Staphylococcus* coagulase negativa	*Staphylococcus* coagulase negativa	NC	5971
	(+)	*Streptococcus* spp.	*Streptococcus mitis*	2	5600
	(+)	*Aerococcus* spp.	*Aerococcus* spp.	NC	1200
			Aerococcus viridans 3	NC	800
	(+)	*Corynebacterium* spp.	*Corynebacterium* spp.	2	200
	(+)	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp.	NC	100
	(+)	*Cellulomonas* spp. / *Microbacterium* spp.	*Cellulomonas* spp. / *Microbacterium* spp.	NC	100
Contagem média do total de bactérias = 3.6x 10^3			Mín = 100	Máx = 3x 10^4	
Maçaneta Balneários	(+)	*Staphylococcus* coagulase negativa	*Staphylococcus* coagulase negativa	NC	1340
Contagem média do total de bactérias = 1.3 x 10^3			Mín = 100	Máx =2.5x 10^3	
Maçaneta Serviços Administrativos	(+)	*Staphylococcus* coagulase negativa	*Staphylococcus* coagulase negativa	NC	2388
	(+)	*Bacillus* spp.	*Bacillus cereus*	NC	300
Contagem média do total de bactérias = 1.9x 10^3			Mín = 250	Máx =6x 10^3	

Pontos de Colheita	Gram	Género	Espécie	Classificação	Total
Torneira Instalações Sanitárias/ Balneários	(-)	*Enterobacter* spp.	*Enterobacter cloacae*	2	500
	(-)	*Acinetobacter* spp.	*Acinetobacter baumannii*	NC	400
	(+)	*Staphylococcus* coagulase negativa	*Staphylococcus* coagulase negativa	NC	2892
	(+)	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp.	NC	188
			Bacillus subtilis	NC	100
Contagem média do total de bactérias = $1.9x\ 10^3$			Mín = 100	Máx =1.2×10^4	

Tabela 3 - Médias das contagens totais de cada espécie bacteriana identificada por ponto de colheita e respetiva classificação

Relativamente às espécies fúngicas verifica-se a predominância dos géneros *Penicillium* em todas as superfícies avaliadas, *Candida* spp. e *Rhodotorula* spp. igualmente comuns.

Pontos de Colheita	Género	Espécie	Classificação	Total
Manipulador	*Candida* spp.	*Candida famata*	NC	16077
		Candida lambica	NC	3100
		Candida zeylanoides	NC	1000
		Candida spp.	NC	600
	Penicillium spp.	*Penicillium* spp.	NC	1297
	Rhodotorula spp.	*Rhodotorula glutinis*	NC	1000
	Cladosporium spp.	*Cladosporium* spp.	NC	360
Contagem média do total de fungos = $4.2x\ 10^3$		Mín = 1×10^2	Máx = $4.8x\ 10^4$	
Cacifo	*Penicillium* spp.	*Penicillium* spp.	NC	400
	Rhodotorula spp.	*Rhodotorula* spp.	NC	100
	Cryptococcus spp.	*Cryptococcus curvatus*	NC	100
Contagem média do total de fungos = 2×10^2		Mín = 1×10^2	Máx =$4x\ 10^2$	
Interior Máscara	*Candida* spp.	*Candida* spp.	NC	1250
		Candida lipolytica	NC	100
	Penicillium spp.	*Penicillium* spp.	NC	680
Contagem média do total de fungos = $7.5x\ 10^2$		Mín =1×10^2	Máx = $2.3x\ 10^3$	

Pontos de Colheita	Género	Espécie	Classificação	Total
Maçaneta Balneários	*Rhodotorula* spp.	*Rhodotorula* spp.	NC	3500
	Cryptococcus spp.	*Cryptococcus neoformans* var *neoformans*	2	1800
		Cryptococcus albidus	NC	550
		Cryptococcus laurentii	NC	500
	Candida spp.	*Candida famata*	NC	550
	Cladosporium spp.	*Cladosporium* spp.	NC	200
	Penicillium spp.	*Penicillium* spp.	NC	200
Contagem média do total de fungos = 8.3×10^2		Mín = 1×10^2		Máx = 3.5×10^3
Maçaneta Serviços Administrativos	*Rhodotorula* spp.	*Rhodotorula* spp.	NC	13200
		Rhodotorula mucilaginosa	NC	250
	Cryptococcus spp.	*Cryptococcus laurentii*	NC	3000
		Cryptococcus neoformans var *neoformans*	2	2800
		Cryptococcus uniguttulatus	NC	1000
	Trichosporum spp.	*Trichosporum mucoides*	NC	1300
	Penicillium spp.	*Penicillium* spp.	NC	200
	Candida spp.	*Candida* spp.	NC	175
	Botrytis spp.	*Botrytis* spp.	NC	100
	Aspergillus spp.	*Aspergillus flavus*	NC	100
	Cladosporium spp.	*Cladosporium* spp.	NC	100
Contagem média do total de fungos = 6.4×10^3		Mín = 1×10^2		Máx = 4×10^4
Torneira Instalações Sanitárias/ Balneários	*Penicillium* spp.	*Penicillium* spp.	NC	378
	Cryptococcus spp.	*Cryptococcus curvatus*	NC	200
	Candida spp.	*Candida sake*	NC	200
		Candida famata	NC	163
		Candida spp.	NC	100
	Aspergillus spp.	*Aspergillus flavus*	NC	100
	Rhodotorula spp.	*Rhodotorula* spp.	NC	100
	Botrytis spp.	*Botrytis* spp.	NC	100
	Cladosporium spp.	*Cladosporium* spp.	NC	100
Contagem média do total de fungos = 2.2×10^2		Mín = 1×10^2		Máx = 1.3×10^3

Tabela 4 - Médias das contagens totais de cada espécie fúngica identificada por ponto de colheita e respetiva classificação

DISCUSSÃO

A legislação europeia, através da Diretiva 2000/54/CE, tem como objetivo principal a redução dos riscos resultantes da exposição aos agentes biológicos no local de trabalho. A Agência Europeia para a Promoção da Segurança e Saúde do Trabalho reforça a necessidade crescente no desenvolvimento de ferramentas para de avaliação de riscos e

prevenção, acompanhadas de programas de vigilância médica, vigilância biológica e outros dados de saúde, com vista o desenvolvimento de estratégias para a prevenção da doença assentes na identificação dos agentes biológicos a que trabalhadores estão expostos, (European Agency for Safety and Health at Work., 2013).

Vários estudos têm valorizado a exposição a agentes biológicos nas operações de triagem de resíduos. No caso da triagem de resíduos urbanos não separados na origem, foram reportadas contaminações ambientais de 10^3-10^5 ufc/m^3 para fungos e 10^3-10^4 ufc/m^3 para bactérias (Kiviranta et al., 1999; Malmros, Sigsgaard, & Bach, 1992; Poulsen et al., 1995). Em unidades de triagem de resíduos provenientes da recolha seletiva é espectável que a carga microbiana existente no material a triar seja significativamente inferior apresentando, à partida, menor risco de aerossolização de agentes biológicos aquando o seu manuseamento. Os resultados revelam a existência de contaminação ambiental expressiva na ZC, com contagens médias superiores nos postos dedicados à triagem de resíduos, sendo a microflora ambiental maioritariamente constituída por fungos. As concentrações de bactérias e fungos nas operações de triagem (10^2 e 10^4 ufc / m^3, respetivamente) são inferiores às reportadas por Kiviranta *et al*. (1999), que relataram concentrações médias de fungos 100 vezes superiores nas operações de triagem (1,1 × 10^5 ufc / m^3), em comparação com a deposição final de resíduos em aterro (Kiviranta et al., 1999). Esta realidade, aliada à existência de espécies distintas às existentes na amostra de referência reforçam a relevância das condições estruturais e funcionais da indústria dos resíduos, aflorando a necessidade de estabelecimento de medidas de caráter coletivo nos espaços destinados à triagem manual de resíduos. De acordo com Lacey e Dutkiewicz, a medida mais eficaz para a prevenção de doenças ocupacionais resultantes da exposição a agentes biológicos centra-se na redução da exposição a poeiras no local de trabalho, através da implementação de sistemas de ventilação e exaustão eficazes (Dutkiewicz, 1997; Lacey & Dutkiewicz, 1994). Os postos de trabalho afetos à triagem de resíduos na empresa estudada resumem-se à triagem grosseira e compactação dos resíduos selecionados em espaço localizado na nave de triagem, próximo do local de armazenagem de material a triar. Apesar de toda a envolvente ambiental verificada, foram aferidas contaminações ambientais por bactérias e fungos inferiores às verificadas por Nersting *et al*. em vários postos de trabalho dedicados ao tratamento de resíduos. (6,3x10^4 ufc/m^3 - microrganismos totais) (Nersting, Malmros, Sigsgaard, & Petersen, 1991). Park. et al (2013) reportaram valores contaminações ambientais de 1.6 x 10^4 ufc/m^3 e 1.8 x 10^4 ufc/m^3 de bactérias e fungos viáveis, associando concentrações superiores nas operações específicas de triagem de resíduos (3.1 x 10^4 ufc/m^3 e 4.3 x 10^4 ufc/m^3) (D. Park et al., 2013).

A deposição final de resíduos em aterro é igualmente processada em ambiente fechado. O operador desenvolve operações de distribuição e compactação de resíduos nas células de aterro, manobrando uma pá carregadora e/ou compactador. Os referidos

equipamentos possuem ventilação forçada associado a sistema de climatização, reforçando a importância do estabelecimento de rotinas de manutenção e higienização a estes sistemas. A média da contagem total de bactérias e fungos viáveis (2.8×10^2 ufc/m^3 e 8.2×10^2 ufc/m^3) é inferior à aferida por Hannu Kiviranta *et al*. numa investigação desenvolvida em diferentes tipos de operações de tratamento e deposição final de resíduos (Kiviranta et al., 1999) no período de verão, realçando a importância dos fatores ambientais na viabilidade dos microrganismos. A indústria estudada localiza-se no interior norte do País, onde se verificam grandes amplitudes térmicas entre as estações estivais. No período de colheitas verificou-se a existência de temperaturas baixas nas estações frias e temperaturas moderadas nas estações de aquecimento (colheitas efetuadas até o mês de Junho).

A caracterização microbiológica das amostras ambientais da ZC revelou a predominância dos géneros *Staphylococcus* (coagulase negativa) e *Bacillus,* tendência igualmente verificada nas colheitas de superfície e mãos de operadores de resíduos. A predominância dos referidos géneros em amostras ambientais foi estudada por Krajewski *et al*. (Krajewski, Tarkowski, Cyprowski, Szarapińska-Kwaszewska, & Dudkiewicz, 2002), embora com níveis de exposição distintos. Os géneros fúngicos mais comuns na ZC foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*, igualmente avaliados nas superfícies estudas, embora nestes pontos se tenha verificado a predominância espécies do género *Candida* e *Rhodoturula*. Foram identificadas potenciais espécies produtoras de micotoxinas do género *Aspergillus (A. Flavus e A. Niger)* nas amostras ambientais à semelhança de outros estudos (Kiviranta et al., 1999; Carla Viegas et al., 2014), realçando a sua relevância clínica associada ao risco para a saúde humana.

O *Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Securité du Travail* (2001) reforça a relevância da existência de outras fontes de exposição ocupacional a agentes biológicos além da exposição respiratória, referindo a ingestão e o contato como formas possíveis de exposição (Goyer et al., 2001). De facto, a ingestão de agentes biológicos em contexto ocupacional resume-se a episódios acidentais, traduzidos pelo contato das mãos com a boca, resultando habitualmente em sintomas gastrointestinais no hospedeiro. Desta forma, fontes de contaminação, no caso concreto em estudo, os resíduos valorizáveis ou para deposição final, não devem se manipulados com as mãos.

O termo *fomite* tem sido frequentemente associado a questões relacionadas com saúde pública, mais concretamente infeções nosocomiais, não tendo sido estudado em contexto de saúde ocupacional. Contudo, não será de difícil entendimento o facto dos agentes biológicos, sendo eles bactérias, fungos ou mesmo vírus poderem ser, em contexto ocupacional, veiculados através de superfícies de contato ou mesmo através de contato direto (pele). O presente estudo revelou a existência de contaminação expressiva por bactérias e fungos viáveis nas superfícies avaliadas e mãos dos operadores de resíduos. Os agentes infeciosos podem perdurar nas superfícies de contacto por assinaláveis

períodos, podendo, em alguns casos, atingir meses (Scott & Bloomfield, 1990). De uma forma geral, a potencialidade de uma *fomite* na disseminação de um dado agente infecioso encontra-se diretamente relacionada com a capacidade do agente em sobreviver sobre essa superfície. Neste âmbito, a lavagem das mãos adequada e regular, bem como a desinfeção de superfícies pode desempenhar um papel na minimização a propagação de agentes biológicos (Ansari, Springthorpe, Sattar, Rivard, & Rahman, 1991), particularmente em indústrias caraterizadas pela exposição ocupacional a agentes biológicos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo apontam para a existência de uma contaminação expressiva de bactérias e fungos viáveis na atmosfera de trabalho, superfície e mãos dos operadores da indústria de resíduos. Os níveis de contaminação ambiental mais elevados foram verificados na triagem de resíduos, demonstrando a importância da avaliação de riscos na fase de projeto dos locais reservados para o efeito, de forma a minimizar a formação e proliferação de agentes biológicos nos postos de trabalho. As mãos dos operadores encontram-se ricamente colonizadas por bactérias e fungos, podendo traduzir a prevalência de práticas incorretas de higienização das mãos ou a inexistência de condições estruturais que permitam a concretização de tal prática.

Os resultados decorrentes desta investigação reforçam a necessidade da existência de planos de formação específicos relacionados com a exposição ocupacional a agentes biológicos adotados paralelamente com medidas organizacionais e de engenharia, bem como medidas de proteção coletiva reforçadas pela implementação de medidas de índole individual.

REFERÊNCIAS

Ansari, A., Springthorpe, S., Sattar, S., Rivard, S., & Rahman, M. (1991). Potential role of hands in the spread of respiratory viral infections: Studies with human parainfluenza virus 3 and rhinovirus 14. *Journal of Clinical Microbiology*, *29*(10), 2115-2119. Acedido em http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=270283&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Anupam, D., Kansal, R., Asthana, A. K., Pandey, A., & Madan, M. (2011). e- Fomites. *Annals of Biological Research*, *2*(2), 111–115. Acedido em http://scholarsresearchlibrary.com/ABR-vol2-iss2/ABR-2011-2-2-111-115.pdf

Boone, S. A, & Gerba, C. P. (2005). The occurrence of influenza A virus on household and day care center fomites. *The Journal of Infection*, *51*(2), 103–109. doi:10.1016/j.jinf.2004.09.011

Boone, S. A, & Gerba, C. P. (2007). Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(6), 1687-1696. doi:10.1128/AEM.02051-06

Douwes, J., Eduard, W., & Thorne, P. S. (2008). Bioaerosols. *International Encyclopedia of Public Health*, *1*, 287-297.

Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., & Heederik, D. (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment : Progress and prospects. *Annals of Occupational Hygiene*, *47*(3), 187-200. Acedido em http://annhyg.oxfordjournals.org/content/47/3/187.long

Dutkiewicz, J. (1997). Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *4*, 11–16.

Dutkiewicz, J., Cisak, E., Sroka, J., Wójcik-fatla, A., & Zając, V. (2011). Biological agents as occupational hazards - selected issues. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *18*(2), 286-293.

European Agency for Safety and Health at Work. (2013). *Priorities for occupational safety and health research in Europe : 2013-2020*. Luxembourg: Publications Office of the European Union. Acedido em https://osha.europa.eu/pt/tools-and-publications/publications/reports/priorities-for-occupational-safety-and-health-research-in-europe-2013-2020

Goyer, N., Lavoie, J., Lazure, L., & Marchand, G. (2001). *Bioaerosols in the workplace: Evaluations, control and prevention guide*. Montréal, Québec: IRSST - Direction des communications. Acedido em http://www.irsst.qc.ca/media/documents/pubirsst/T-24.pdf

Julian, T. R., Leckie, J. O., & Boehm, A. B. (2010). Virus transfer between fingerpads and fomites. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(6), 1868–1874. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04814.x

Kiviranta, H., Tuomainen, A., Reiman, M., Laitinen, S., Nevalainen, A., & Liesivuori, J. (1999). Exposure to airborne microorganisms and volatile organic compounds in different types of waste handling. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, (6), 39-44.

Krajewski, J. A., Tarkowski, S., Cyprowski, M., Szarapińska-Kwaszewska, J., & Dudkiewicz, B. (2002). Occupational exposure to organic dust associated with municipal waste collection and management. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, *15*(3), 289-301. acedido em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12462456

Kramer, A., Schwebke, I., & Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, *6*, 130. doi: 10.1186/1471-2334-6-130

Krieg, N. R., Bergey, D. H., & Holt, J. G. (Eds.). (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vol. 1). Baltimore: Williams & Wilkins.

Lacey, J., & Dutkiewicz, J. (1994). Bioaerosols and occupational lung disease. *Journal of Aerosol Science*, *25*, 1371–1404.

Maier, R. M., Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (2009). *Environmental microbiology* (2nd ed.). Elsevier/ Academic Press.

Malmros, P., Sigsgaard, T., & Bach, B. (1992). Occupational health problems due to garbage sorting. *Waste Management & Research*, *10*(3), 227–234.

Macher, J. (Ed.). (1999). *Bioaerosols: Assessment and control*. Ohio: American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH).

Portaria n.º 405/98. (1998, Julho 11). Aprova a classificação dos agentes biológicos. Diário da República, 1(158), pp. 3308-3314. Acedido em https://dre.pt/application/file/484768

Portaria nº 1036/98. (1998, Dezembro 15). Altera a lista dos agentes biológicos classificados para efeitos da prevenção de riscos profissionais, aprovada pela Portaria n.º 405/98, de 11 de Julho. Diário da República, 1(288), pp. 6835-6843. Acedido em https://dre.pt/application/file/219403

Nersting, L., Malmros, P., Sigsgaard, T., & Petersen, C. (1991). Biological health risk associated with resource recovery , sorting of recycle waste and composting. *Grana*, 30(2), 454-457. doi:10.1080/00173139109432008

Park, D., Ryu, S., Kim, S., Byun, H., Yoon, C., & Lee, K. (2013). Airborne bacteria and fungi associated with waste-handling work. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, *19*(4), 311-318.

Park, D.-U., Ryu, S.-H., Kim, S.-B., & Yoon, C.-S. (2011). An assessment of dust, endotoxin, and microorganism exposure during waste collection and sorting. *Journal of the Air & Waste Management Association*, *61*(4), 461–468. Acedido em http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3155/1047-3289.61.4.461?needAccess=true

Porta, D., Milani, S., Lazzarino, A. I., Perucci, C. A., & Forastiere, F. (2009). Systematic review of epidemiological studies on health effects associated with management of solid waste. *Environmental Health*, *8*(60), 1-14. doi:10.1186/1476-069X-8-60

Poulsen, O. M., Breum, N., Ebbehoj, N., Hansen, A. M., Ivens, U. I., Lelieveld, D. Van, … Wilkins, K. C. (1995). Sorting and recycling of domestic waste: Review of occupational health problems and their possible causes. *The Science of the Total Environment*, *168*, 33–56.

Scott, E., & Bloomfield, S. F. (1990). The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. *Journal of Applied Microbiology*, *68*(3), 271–278.

Sneath, P. H. A., Mair, N., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (Eds). (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vol. 2). Baltimore: Wilkins & William.

Stetzenbach, L. D. (2002). Introduction to aerobiology. In C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, & L. D. Stetzenbach (Eds.), *Manual of environmental microbiology* (2nd ed., pp. 801–813). Washington DC: ASM Press.

Tacconelli, E. (2011). When did the doctors become fomites? *Clinical Microbiology and Infection*, *17*(6), 794–796. Acedido em http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14619704

Vasconcelos Pinto, M., Veiga, J. M., Fernandes, P., Ramos, C., Gonçalves, S., Vaz Velho, M., & Santos Guerreiro, J. (2015). Airborne microorganisms associated with packaging glass sorting facilities. *Journal of Toxicology and Environmental Health, 78*(11), 685–696. Acedido em http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15287394.2015.1021942

Viegas, C., Gomes, A. Q., Abegão, J., Sabino, R., Graça, T., & Viegas, S. (2014). Assessment of fungal contamination in waste sorting and incineration-case study in portugal. *Journal of Toxicology and Environmental Health. 77*(1-3), 57–68. Acedido em http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287394.2014.865583

Viegas, C., Malta-Vacas, J., Sabino, R., Viegas, S., & Veríssimo, C. (2014). Accessing indoor fungal contamination using conventional and molecular methods in Portuguese poultries. *Environmental Monitoring and Assessment*, *186*(3), 1951-1959. doi:10.1007/s10661-013-3509-4

Walser, S. M., Gerstner, D. G., Brenner, B., Bünger, J., Eikmann, T., Janssen, B., … Herr, C. E. W. (2015). Evaluation of exposure-response relationships for health effects of microbial bioaerosols: A systematic review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *218*(7), 577-589. Acedido em http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463915001005

Wan, M. P. (2010). Modeling the pathogen exposure and infection risk associated with fomite transmission in an aircraft cabin mock-up. In *2nd International ISCM Symposium and the 12th International EPMESC Conference* (pp. 1576–1582). New York: American Institute of Physics.

Williams, S. T., Sharpe, M. E, Holt, J. G. (Eds). (1989). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vol. 4). Baltimore: Williams & Wilkins.

CAPÍTULO 7

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE BACTERIOLÓGICA DE SUCOS DETOX/VERDES

Data de aceite: 19/01/2021

Thamyres Samara dos Santos Melo
http://lattes.cnpq.br/1161710332643192

José Samuel de Lima
http://lattes.cnpq.br/6322995952530013

Maria Aduclécia de Lima
http://lattes.cnpq.br/6235812211027075

Agenor Tavares Jacome Junior
http://lattes.cnpq.br/3765760153191048

RESUMO: A *Brassica oleracea* é uma hortaliça com atividade antioxidante utilizada como ingrediente no preparo de sucos "detox". Em controverso aos benefícios do consumo de sucos "detox" com couve-folha, as condutas de preparo, sanitização ou armazenamento quando não realizadas de forma adequada podem interferir na qualidade microbiológica do alimento. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade bacteriológica de sucos "detox"/ verde comercializados no município de Caruaru-PE. Foram analisadas 30 amostras, através da técnica *pour plate* para contagem de bactérias heterotróficas, por meio da técnica de tubos múltiplos foi investigada a presença de coliformes totais e termotolerantes, e *spread plate* para identificação de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa.* Todas as amostras analisadas apresentaram um alto número na contagem total de bactérias heterotróficas, bem como a presença de coliformes totais. De acordo com a RDC 331/2019, 30% das amostras analisadas apresentavam índice maior que o permitido para coliformes termotolerantes. Foi identificada a presença de *Pseudomonas aeruginosa e de Staphylococcus aureus* em concentrações suficientes para produção de toxinas. Conclui-se que as amostras de alimento analisadas podem ser classificadas como uma fonte de risco à saúde pública, visto que foram detectados microrganismos indicadores de contaminação por fezes e material orgânico que comprovam desvios na qualidade higiênico sanitária das amostras analisadas.

PALAVRAS-CHAVE: Contaminantes. Dieta saudável. Microbiologia de alimentos. Enterobacter.

EVALUATION OF THE BACTERIOLOGICAL QUALITY OF DETOX / GREEN JUICES

ABSTRACT: *Brassica oleracea* is a vegetable with antioxidant activity used as an ingredient in the preparation of "detox" juices. Controversial about the benefits of consuming "detox" juices with kale, preparation, sanitization or storage conducts when not carried out properly can interfere with the microbiological quality of the food. Thus, the present study aimed to assess the bacteriological quality of "detox" / green juices marketed in the municipality of Caruaru-PE. Thirty samples were analyzed using the pour plate technique for counting heterotrophic bacteria, using the multi-tube technique, the presence of total and thermotolerant coliforms, and spread plate to identify *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were

investigated. All samples analyzed showed a high number in the total count of heterotrophic bacteria, as well as the presence of total coliforms. According to RDC 331/2019, 30% of the analyzed samples had an index higher than that allowed for thermotolerant coliforms. The presence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in concentrations sufficient to produce toxins was identified. It is concluded that the analyzed food samples can be classified as a source of risk to public health, since microorganisms were detected that indicate contamination by feces and organic material that prove deviations in the sanitary hygienic quality of the analyzed samples.
KEYWORDS: Air pollutants**.** Healthy diet. Food Microbiology. Enterobacter.

1 I INTRODUÇÃO

A busca por uma boa qualidade de vida vem tornando-se mais assídua, pois, isto remete diretamente à saúde. Um fator fundamental que está aliado a saúde é a alimentação, a qual, através de uma dieta saudável, tem a capacidade de auxiliar positivamente no metabolismo do organismo. Dentre estes alimentos, podemos citar as frutas e hortaliças, que são ricas fontes de compostos benéficos à saúde, como as vitaminas e minerais. Dados epidemiológicos mostram que existe uma grande e inversa correlação entre o consumo regular de frutas e hortaliças e a prevalência de certas doenças degenerativas[1].

A constatação de que nos vegetais são encontradas substâncias ativas biologicamente e que estas são benéficas à saúde ou desempenham efeitos fisiológicos desejáveis, têm estimulado a realização de estudos sobre as suas propriedades antioxidantes[1]. Uma hortaliça com atividade antioxidante é a *Brassica oleracea,* conhecida popularmente como a couve-folha. Devido a esta atividade, a *Brassica oleracea* tem sido bastante utilizada como um dos principais ingredientes no preparo de sucos "detox", conhecidos também como sucos verdes ou funcionais.

Dentre os alimentos considerados funcionais, estão enquadrados aqueles que apresentam compostos com atividade antioxidante, que inibem ou diminuem as implicações causadas pelos radicais livres. Além dos efeitos benéficos oriundos do consumo de sucos "detox"/verdes e consequentemente da couve-folha, estes podem também interferir de forma negativa sobre a saúde, a depender de boas condutas de cultivo, preparo, sanitização ou armazenamento para ambos. Sendo estas etapas não realizadas de forma adequada, a qualidade microbiológica do alimento é diretamente afetada.

Há mais de uma fonte de contaminação por microrganismos que interferem na qualidade e segurança microbiológica do suco, enquadrando também microrganismos patogênicos. A primeira está relacionada ao principal ingrediente do suco, a folha da couve, a qual pode apresentar contaminação oriunda do seu cultivo, sendo possível a presença de microrganismos patogênicos através da contaminação da água utilizada durante o desenvolvimento do vegetal, ou ainda por falta de condições higiênico-sanitárias no que diz respeito ao manejo até o armazenamento de forma inadequada, o que o torna um substrato

propício a degradação por microrganismos.

Além disso, durante o processamento do suco, a água ou ingredientes coadjuvantes utilizados na composição do mesmo, podem apresentar altos níveis de contaminação, o que interfere diretamente na qualidade higiênico sanitária do suco. A higienização incorreta dos utensílios usados no processo de fabricação pode torná-lo um grande contaminante do alimento.

Tendo em vista que o consumo de alimentos contaminados poderá ocasionar implicações à saúde humana, o presente estudo teve como objetivo analisar a qualidade bacteriológica dos sucos "detox"/verdes comercializados no município de Caruaru-PE, os quais possuíam a couve-folha (*Brassica oleracea*) como ingrediente no preparo. A qualidade bacteriológica do suco será determinada através da contagem total de bactérias heterotróficas, identificação de indicador de contaminação por manipulação (*Staphylococcus aureus*), contaminação por material orgânico (*Pseudomonas aeruginosa*), presença de coliformes totais e termotolerantes, sendo este um indicador de contaminação de origem fecal. Logo essa pesquisa através de seus procedimentos analíticos, fornece dados e informações para que a população, comerciantes e autoridades sanitárias possam exercer ou exigir um maior controle na qualidade higiênico sanitária desses alimentos.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Tipo de estudo, coleta e amostragem

O presente estudo consistiu em uma pesquisa experimental laboratorial. A coleta do suco "detox"/verde foi realizada nas principais academias e casas de suco localizadas no município de Caruaru-PE. O cálculo utilizado para se determinar o número de locais que foram analisados e a quantidade de amostra a ser coletada em todos os locais de comércio foi feito de acordo com o plano de amostragem descrito no *Codex Alimentárius.* As amostras foram coletadas no período de julho a agosto de 2019, em 10 estabelecimentos diferentes, sendo um total de 30 amostras, ao qual de cada estabelecimento foram coletadas 3 amostras com intervalo de 1 semana entre cada coleta, de modo a avaliar possíveis variações. Como critério todas as amostras de suco coletadas tinham incluído a couve como ingrediente no preparo.

Em cada estabelecimento, foram coletadas amostras do suco nas mesmas embalagens em que estes eram vendidos. Posteriormente o alimento líquido foi transferido para sacos plásticos estéreis previamente identificados com capacidade de 150mL. Em seguida foi realizado o transporte das amostras sob refrigeração em caixa isotérmica, sob condições assépticas, para análise bacteriológica no laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico de Alimentos do Centro Universitário Tabosa de Almeida (ASCES-UNITA).

2.2 Análise bacteriológica

As técnicas utilizadas foram as preconizadas pelo *American Public Health Association* (APHA)[2], 23ª edição de 2017.

2.2.1 Coliformes totais e termotolerantes

Para pesquisa de coliformes totais e termotolerantes, utilizou-se a técnica dos tubos múltiplos recomendada pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* em triplicata[3]. Para o teste presuntivo o meio de cultura utilizado foi o caldo lactosado, em séries de 5 tubos, incubados por 48 horas, em estufa a 32,5±2,5ºC, na etapa confirmatória, para coliformes totais, o meio caldo verde brilhante bile a 2% nas mesmas condições de incubação e caldo EC, para coliformes termotolerantes, incubados a 42,5±2,5ºC.

2.2.2 Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa

As amostras foram submetidas à análise pelo método s*pread plate*, de modo que um inóculo de 1mL de cada amostra diluída, foi distribuído na superfície de três placas previamente preparadas de ágar baird-parker (BP), para pesquisa de *S. aureus*, e ágar cetrimide, para *P. aeruginosa*. Os inóculos foram espalhados pela placa com auxílio de uma alça de *Drigalski*. Após completa absorção da amostra, as placas foram incubadas de forma invertida em estufa, sob temperatura de 32,5±2,5ºC durante 48 horas.

Nas placas de BP, foram contadas apenas as colônias que apresentaram características típicas de *S. aureus*. Estas colônias foram submetidas aos testes confirmatórios de catalase e coagulase. Para identificação da presença de *P. aeruginosa* em ágar cetrimide, as placas que apresentaram crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC), foram submetidas à luz UV. A característica que define o teste presuntivo como positivo, é a presença de pigmento esverdeado fluorescente das colônias sob a luz UV. Para confirmação foi realizado o teste de oxidase das colônias que apresentaram fluorescência.

2.2.3 Bactérias heterotróficas

A técnica *pour plate* foi utilizada para contagem total de bactérias heterotróficas, sendo o meio para cultura o Plate Count Agar (PCA). Para cada amostra foi realizada seis inoculações em placas de Petri, de duas diluições diferentes, sendo três placas para cada concentração. Cada placa de Petri, vazia e estéril previamente identificada, recebeu um inóculo de 1mL, em seguida foi vertido aproximadamente 15 mL de PCA fundido, por fim foi realizada a homogeneização. Após solidificação do meio, as placas foram incubadas invertidas a temperatura de 32,5 ± 2,5ºC. O período de incubação foi de 72 horas. A partir da contagem do número de colônias crescidas em cada placa é calculada a média das

Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL) para cada diluição e amostra diferente.

3 I RESULTADOS E DISCUSSÕES

No Brasil não existe legislação vigente que determine como deve ser a manipulação de alimentos minimamente processados[3]. Porém, existem as Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC), estabelecidas pela ANVISA, que foram desenvolvidas para estabelecer boas práticas de manipulação e produção de alimentos, minimizando as doenças transmitidas pelos alimentos.

A RDC nº 331 de 23 de dezembro de 2019, que dispõe de princípios gerais e critérios para padrões microbiológicos de alimentos, estabelece que para sucos "*in natura*", são permitidas contagens de *Escherichia coli* de até 10^2/mL, a qual é um coliforme termotolerante, já a *Salmonella sp* a cada 25mL de amostra indicativa, deve estar ausente. Tomando como base a RDC 331/2019, apenas 30% das amostras analisadas no estudo apresentaram índices de contaminação maior que o permitido para pesquisa de coliformes termotolerantes.

De acordo com os resultados obtidos todas das amostras apresentaram elevada contagem de bactérias heterotróficas. Foi encontrada uma variação de $3 \pm 1,1 \times 10^4$ UFC/mL a $>2 \times 10^6$ UFC/mL para essa análise. Com isso, foi visto que todas as amostras tiveram a contagem de bactérias heterotróficas maior que 10^4 UFC/mL. Na etapa confirmatória do teste de coliformes, 100% das amostras apresentaram a presença de coliformes totais (Tabela 1) e 50% tiveram resultado positivo para coliformes termotolerantes, porém apenas parte destas (30%) apresentaram índices fora da especificação de acordo com os limites estabelecidos pela ANVISA, visto que *Escherichia coli* é o microrganismo que representa o grupo coliformes termotolerantes (Tabela 2).

Amostras	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
A1	>1600 NMP/100mL	220 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL
A2	7 NMP/100mL	500 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL
A3	>1600 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL	350 NMP/100mL
A4	>1600 NMP/100mL	1600 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL
A5	1600 NMP/100mL	1600 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL
A6	>1600 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL
A7	8 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL	2 NMP/100mL
A8	1600 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL
A9	>1600 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL
A10	17 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL	1600 NMP/100mL

Tabela 1- Resultado da análise do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais em suco "detox"/verde.

Amostras	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
A1	4 NMP/100mL	<2 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL
A2	<2 NMP/100mL	<2 NMP/100mL	<2 NMP/100mL
A3	<2 NMP/100mL	1600 NMP/100mL	6 NMP/100mL
A4	<2 NMP/100mL	<2 NMP/100mL	350 NMP/100mL
A5	1600 NMP/100mL	2 NMP/100mL	<2 NMP/100mL
A6	<2 NMP/100mL	<2 NMP/100mL	350 NMP/100mL
A7	<2 NMP/100mL	170 NMP/100mL	<2 NMP/100mL
A8	>1600 NMP/100mL	>1600 NMP/100mL	<2 NMP/100mL
A9	<2 NMP/100mL	1600 NMP/100mL	1600 NMP/100mL
A10	<2 NMP/100mL	2 NMP/100mL	4 NMP/100mL

Tabela 2- Resultado da análise do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais em suco "detox"/verde.

Outros patógenos oportunistas e que também fazem parte da microbiota normal humana foram identificados em parte das amostras. Entre estes alguns já possuem muitos estudos clínicos quanto a sua capacidade de resistência, principalmente em ambiente hospitalar. Um exemplo é a *Pseudomonas aeruginosa*, a qual atualmente se posiciona entre as principais bactérias causadoras de infecções hospitalares, além das espécies *Staphylococcus* coagulase negativo e *o Staphylococcus aureus* [4].

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva, catalase-positiva, imóvel, não-esporulada e não-encapsulada, comumente encontrada na microbiota da pele de pessoas saudáveis. No entanto, com a baixa da imunidade, a bactéria pode causar doenças graves como pneumonia, meningite e endocardite. Devido a sua capacidade adaptativa, são encontradas cepas resistentes aos antibióticos de uso comum. O uso irracional de medicamentos, principalmente de antimicrobianos, é o principal fator responsável pelo surgimento de cepas multirresistentes[5]. A mesma é produtora de toxinas e podem resultar em danos à saúde de quem a ingerir, calcula-se que a ingestão de apenas 1 mg da toxina produzida por *Staphylococcus aureus* seja suficiente para o desenvolvimento de sintomas em seres humanos[6]. Diante disso 23,4% das amostras analisadas apresentaram potencial de produção de toxinas pelo *Staphylococcus aureus* com capacidade de causar algum sintoma ao seu consumidor.

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa, um dos principais causadores de infecções hospitalares, em geral em pacientes imunodeprimidos. Trata-se da principal bactéria em relação ao tema de resistências a antibióticos, sobretudo aqueles de amplo-espectro e sua resistência é derivada especialmente da produção de enzimas beta-lactamase. Um estudo realizado por Figueiredo[7], revelou que 49,7% das cepas de *P. aeruginosa* eram resistentes à três ou mais antibióticos e revelou ainda que 28% eram resistentes a seis antibióticos ou mais, evidenciando a capacidade de adaptação da bactéria,

necessitando ainda mais de novas formas para combater as cepas multirresistentes.

O patógeno indicador de contaminação por manipulação, *S. aureus*, estava presente em 76,7% das amostras em quantidades variáveis. Porém 23,4% destas apresentaram quantidade de UFC suficientes para produção de toxinas.

4 I CONCLUSÃO

O presente estudo explorou o alimento analisado, concluindo que todas as amostras avaliadas apresentaram alguma não conformidade, incluindo um alto número na contagem total de bactérias heterotróficas, bem como a presença de coliformes totais. De acordo com a RDC 331/2019, 30% das amostras analisadas apresentaram índice maior que o permitido para coliformes termotolerantes. Foi identificada também a presença de *Pseudomonas aeruginosa e de Staphylococcus aureus* em concentrações suficientes para produção de toxinas.

Visto que foram detectados microrganismos patogênicos que comprovam desvios na qualidade das amostras, sugestivas de más condições higiênico-sanitárias no processamento do produto, o mesmo pode ser classificado como uma fonte de risco à saúde pública. Dessa forma é de suma importância alertar os manipuladores de alimentos sobre as Boas Práticas de Manipulação de Alimentos, assim como seu armazenamento correto e seguir as recomendações necessárias para que os consumidores possam ter acesso a alimentos seguros e de boa qualidade.

REFERÊNCIAS

1 MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v 26, n 3, p 639-644, jul.-set. 2006.

2 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATON – AWWA; WATER ENVIRONMENT ASSOCIATION- WEF. Standard methods for the examination of water & wastewater. 23st edition. Washington, 2017.

3 BADARÓ, A.C.L.; AZEREDO, R.M.C.; ALMEIDA, M.E.F. Vigilância Sanitária de Alimentos: uma revisão, NUTRIR GERAIS – Revista Digital de Nutrição – Ipatinga: Unileste-MG, V. 1 – N. 1, ago.- dez. 2007.

4 SADER H.S. *et al*. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Braz J Infect Dis, 2001;5:200-214.

5 SALES, L. M.; SILVA, T. M. *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente: Um Desafio Para a Saúde Pública. Acta Biomedica Brasiliensia, v. 3, n. 1, p.1-13, 2012.

6 Corbia, A, C, G; Nascimento, M, G, F; Oliveira, C, Z, F; Nascimento, E, R. Staphylococcus aureus: Importância Para a Saúde Pública e Aspectos Epidemiológicos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia-CNPAB, dez. 2000. v.114, p.1-15.

7 FIGUEIREDO, E. A. P. *et al. Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. Revista Brasileira de Terapia Intensiva, v. 19, n. 4, p. 421-427, 2007.

8 ABREU, I.M.O.; JUNQUEIRA, A.M.R.; PEIXOTO, J.R.; OLIVEIRA, S.A. Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v 30, n 1, p 108-118, maio 2010.

9 ALMEIDA, A.G.; RESENDE, A.; Análise microbiológica em alfaces (*Lactuca sativa* L.) e couves (*Brassica oleracea* L.) minimamente processadas e comercializadas em Brasília-DF, SaBios: Ver. Saúde e Biol., v 7, n 3, p 52-59, set.-dez., 2012.

10 BADARÓ, A.C.L.; AZEREDO, R.M.C.; ALMEIDA, M.E.F. Vigilância Sanitária de Alimentos: uma revisão, NUTRIR GERAIS – Revista Digital de Nutrição – Ipatinga: Unileste-MG, V. 1 – N. 1, ago.- dez. 2007.

11 BRITO, C.S.; ROSSI, D.P. Bolores e leveduras, coliformes totais e fecais em sucos de laranja *in natura* e industrializados não pasteurizados comercializados na cidade de Uberlândia-MG. Uberlândia, v21, n 1, p 122-140, jan - abril 2005.

12 FRODER, H. Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria Monocytogenes* em saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas. Universidade de São Paulo, 2005.

13 GARCIA, R.C.G.; SANTOS, D.C.; OLIVEIRA, E.N.A.; JOSINO, S.A.; MORI, E. Qualidade microbiológica de sucos *in natura* comercializados na cidade de Juazeiro do Norte-CE. ISSN: 1981-3686, Ponta Grossa v 6, n 1, p 665-670, 2017.

14 LAVINAS, F.C.; ALMEIDA, N.C.; MIGUEL, M.A.L.; LOPES, M.L.M.; VALENTE-MESQUITA, V.L. Estudo da estabilidade química e microbiológica do suco de caju *in natura* armazenado em diferentes condições de estocagem. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v 26, n 4, p 875-883, out.- dez. 2006.

15 MACHADO, P.G.; SPERONI, C.; FERRAZ, J.F.; FIGLESKI, P.D.; KOCH, R.H.; SEVERO, J. Elaboração de suco misto de frutas com potencial funcional e comparação com suco comercial “detox”. Revista CSBEA – v. 3, n. 1, 2017.

16 NOGUEIRA, J.N.; CANTARELLI, P.R.; GALLO, C.R.; MORENO, I.A.M. Efeito da acidificação, fermentação e adição de cálcio na qualidade de couve-flor (*Brassica oleraceae L.*) processada pelo calor. Sci. Agric., Piracicaba. v.50, n 1, p 127-139, fev. - maio, 1993.

17 NOVO, M.C.S.S.; PRELA-PANTANO, A.; DEUBER, R.; TORRES, R.B.; TRANI, P.E.; BRON, I.U.; Morfologia de folhas de couve do banco de germoplasma do Instituto Agronômico. Instituto Agronômico de Campinas – APTA. Campinas, 2010.

18 OLIVEIRA, J.C.; SETTI-PERDIGÃO, P.; SIQUEIRA, K.A.G.; SANTOS, A.C.; MIGUEL, M.A.L. Características microbiológicas do suco de laranja *in natura.* Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v 26, n 2, p 241-245, abr.- jun. 2006

19 PINHEIRO, A.M.; FERNANDES, A.G.; FAI, A.E.C.; PRADO, G.M.; SOUSA, P.H.M.; MAIA, G.A. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v 26, n 1, p 98-103, jan.- mar. 2006.

20 RESOLUÇÃO-RDC Nº 12, DE 02 DE JANEIRO DE 2001, Ministério da Saúde.

21 ROCHA, G.G.; MIYAGI, A.M.C.; GUIMARÃES, L.I.; CARDOSO, V.L.; MATIAS, A.C.G.; ABREU, E.S. Qualidade microbiológica de couve manteiga (Brassica oleracea) minimamente processada comercializada em São Paulo, Brasil. Revista Univap, São José dos Campos-SP-Brasil, v. 20, n. 36, dez.2014.

22 RUSCHEL, C.K.; CARVALHO, H.H.; SOUZA, R.B.; TONDO, E.C. Qualidade microbiológica e físico-química de sucos de laranja comercializados nas vias públicas de Porto Alegre-RS. Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas, v 21, n 1, p 94-97, jan.- abr. 2001.

23 SEBASTIANY, E.; REGO, E.R.; VITAL, M.J.S.; Qualidade microbiológica de polpas de frutas congeladas. Rev Inst Adolfo Lutz, v 68, n 2, p 224-31, 2009.

24 SILVA, A.F.S.; LIMA, C.A.; QUEIROZ, J.J.F.; JÁCOME, P.R.L.A.; JÚNIOR, A.T.J. Análise bacteriológica das águas de irrigação de horticulturas. Rev. Ambient. Água vol. 11 n. 2 Taubaté , Apr. - jun. 2016.

25 TEIXEIRA, B.K.; FERREIRA, M.B.; MODEL, B.P.; BORDIN, L.C.; PINHEIRO, F.C.; NESPOLO, C.R. Microrganismos indicadores de condições higiênico-sanitárias em couve folhosa na região da Fronteira Oeste, RS, Brasil. Anais do VII Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão – Universidade Federal do Pampa.

26 VARGAS, P.N.; HOELZEL, S.C.; ROSA, C.S. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. Alim. Nutr., Araraquara v.19, n.1, p. 11-15, jan.- mar. 2018.

27 SALES, L. M.; SILVA, T. M. *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente: Um Desafio Para a Saúde Pública. Acta Biomedica Brasiliensia, v. 3, n. 1, p.1-13, 2012.

28 FIGUEIREDO, E. A. P. *et al*. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. Revista Brasileira de Terapia Intensiva, v. 19, n. 4, p. 421-427, 2007.

CAPÍTULO 8

OTIMIZAÇÃO DA REMOÇÃO DO CORANTE RODAMINA B UTILIZANDO BIOFILME DE *Bacillus* sp. L26 POR MEIO DE UM DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

Data de aceite: 19/01/2021

Eduardo Beraldo de Morais
Universidade Federal de Mato Grosso UFMT, Faculdade de Arquitetura, Engenharia e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
Cuiabá - MT

Frederico Carlos Martins de Menezes Filho
Universidade Federal de Viçosa – UFV, Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas
Rio Paranaíba - MG

Rossean Golin
Universidade Federal de Mato Grosso UFMT, Faculdade de Arquitetura, Engenharia e Tecnologia, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Laboratório de Microbiologia Sanitária e Ambiental
Cuiabá – MT

Cassiano Ricardo Reinehr Corrêa
Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, Faculdade de Arquitetura, Engenharia e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos, Cuiabá – MT

Ibraim Fantin da Cruz
Universidade Federal de Mato Grosso UFMT, Faculdade de Arquitetura, Engenharia e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
Cuiabá - MT

RESUMO: O tratamento de águas residuárias realizado por processos de adsorção tem se apresentado como alternativa tecnológica de baixo custo, eficiente e ainda sustentável, por meio da utilização de biomassas. O objetivo do presente estudo foi otimizar diferentes condições experimentais (pH: 2 - 10; concentração do adsorvente: 0,5 - 2,5 g/L; concentração de corante: 10 – 50 mg/L e temperatura: 20 – 50 °C) para a remoção do corante Rodamina B (RdB) de solução aquosa, pelo biofilme produzido por *Bacillus* sp. L26. Sendo assim, elaborou-se um planejamento experimental baseado no delineamento composto central rotacional (DCCR) e superfície de resposta, totalizando 28 ensaios, sendo 16 fatoriais, com 4 repetições no ponto central e 8 axiais. A análise estatística realizada para o modelo demonstrou a não significância para a temperatura. Os ensaios de adsorção iniciais realizados se mostraram promissores para a remoção percentual de corante, obtendo-se o valor máximo de 28,20% para pH 4,0, concentração de corante de 20 mg/L e concentração de adsorvente de 2 g/L. Observou-se elevada influência do pH sobre a remoção percentual do corante Rodamina B. Recomenda-se para estudos futuros, a validação experimental, utilizando-se valores reduzidos para o pH e o aumento da concentração de adsorvente na busca da maximização da remoção percentual do corante estudado.

PALAVRAS-CHAVE: Biossorção, remoção de corantes, planejamento experimental, metodologia de superfície de resposta.

OPTIMIZATION OF RHODAMINE B DYE REMOVAL USING BIOFILM OF *Bacillus* sp. L26 THROUGH A CENTRAL COMPOSITE ROTATIONAL DESIGN

ABSTRACT: The treatment of wastewater carried out by adsorption processes has been presented as a low cost, efficient, and sustainable technological alternative through the use of biomasses. The present study aimed to optimize different experimental conditions (pH: 2 - 10; adsorbent concentration: 0.5 - 2.5 g / L; dye concentration: 10 - 50 mg / L and temperature: 20 - 50 ° C) for the removal of Rhodamine B (RdB) dye from aqueous solution, using the biofilm produced by *Bacillus* sp. L26. Therefore, an experimental design based on the central composite rotational design (CCRD) and response surface methodology was elaborated, totaling 28 tests, of which 16 were factorial, with 4 repetitions at the central point and 8 axials. The statistical analysis performed for the model showed no significance for temperature. The initial adsorption tests performed were promising for the percentage removal of dye, obtaining a maximum value of 28.20% for pH 4.0, dye concentration of 20 mg/L, and adsorbent concentration of 2 g/L. There was a high influence of pH on the percentage removal of the Rhodamine B. Experimental validation is recommended for future studies, using reduced values for the pH and increasing the concentration of adsorbent to maximize the percentage removal of the studied dye.

KEYWORDS: Biosorption, dyes removal, experimental design, response surface methodology.

1 | INTRODUÇÃO

O tratamento de águas residuárias é fundamental para o controle da poluição ambiental. Dentre as diversas atividades industriais potencialmente poluidoras, aquelas que usam corantes sintéticos, como as indústrias têxteis, de papel, plástico e borracha, contribuem para a degradação dos corpos d’águas uma vez que suas águas residuárias contém metais pesados, sais, surfactantes, altas concentrações de DBO e DQO e corantes (WATHARKAR et al., 2015). O descarte desses efluentes sem tratamento ou com tratamento insatisfatório nos corpos hídricos traz diversos problemas estéticos, diminuição da atividade fotossintética devido à redução da penetração da luz solar e depleção de oxigênio (SHEHZADI et al., 2014). Além disso, muitos corantes são considerados moléculas tóxicas, genotóxicas ou mesmo carcinogênicas o que reforça a necessidade de sua remoção (GILL; ARORA; CHANDER, 2002).

Diversas tecnologias físicas, químicas e biológicas têm sido desenvolvidas e usadas para o tratamento de águas residuárias contendo corantes. Dentre elas, podem ser citadas a nanofiltração e osmose reversa (CINPERI et al., 2019), radiação gama (RAHMAN BHUIYAN et al., 2016), eletrocoagulação e ozonização (BILIŃSKA et al., 2019)e eletrocatálise (KAUR; KUSHWAHA; SANGAL, 2018). Entretanto, a aplicação dessas tecnologias em escala real geralmente é cara, requer tecnologia de ponta, mão de obra especializada e alto consumo de energia (CASTRO; COSSOLIN; CRISTINA, 2017). Por outro lado, a remoção de poluentes de águas residuárias pelo processo de adsorção tem se apresentado como tecnologia eficiente e de baixo custo. Essa tecnologia possui simplicidade de operação e

capacidade de tratar águas residuárias com altas concentrações de poluentes. Diversos materiais adsorventes têm sido utilizados, especialmente aqueles de origem biológica (biomassas). Palha de arroz (RIBEIRO et al., 2017), casca de banana (OYEKANMI et al., 2019), resíduos de levedura cervejeira (CASTRO; COSSOLIN; CRISTINA, 2017) e células fúngicas (SOUZA et al., 2020)são alguns exemplos de biomassa usadas eficientemente para a adsorção de corantes.

O uso de biomassa microbiana para a biossorção de diferentes poluentes tem sido amplamente estudado. Nath e Ray (NATH; RAY, 2015) aplicaram biomassa seca de *Bacillus cereus* M^1_{16} (MTC 5521) na remoção do corante verde Malaquita de água residuária têxtil sintética. Biofilme formado por *Bacillus amyloliquefaciens* se mostrou eficiente na adsorção de nitrito de solução aquosa (HUI et al., 2018). *Sulfobacillus thermosulfdooxidans*, uma bactéria termo-acidófila, foi capaz de adsorver os metais Ni^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} (HUANG et al., 2020). O interesse pela biomassa microbiana é devido aos diferentes grupos funcionais presentes na sua parede celular, como amina, carboxila, tióis, sulfidrilas e fosfatos, que atuam como sítios eficientes de adsorção.

O processo de adsorção é influenciado por diversos parâmetros como pH, temperatura, concentração do adsorbato, concentração do adsorvente, tempo de contato, entre outros. O estudo da influência desses parâmetros de modo isolado pode ser dispendioso em termos de tempo e custos. Sendo assim, metodologias de planejamento experimental são aplicadas para avaliar a interação desses parâmetros e otimizar o processo de adsorção por meio de um número reduzido de experimentos (ALI et al., 2018).

Consoante Abbasi et al. (2016), a metodologia da superfície de respostas (MSR) constitui importante ferramenta para investigar o efeito da variação simultânea de diversas variáveis sobre as respostas de um processo, considerando um número limitado de ensaios. Baseia-se no ajuste de uma equação polinomial com dados experimentais, sendo aplicada quando uma resposta ou conjunto de respostas de interesse são influenciadas por diversas variáveis (ARCHIN et al., 2019).

Neste enfoque, o Delineamento Composto Central (DCC) é uma das abordagens mais importantes e frequentes dentre os planejamentos usando MSR (MOUSAVI et al., 2018; ARCHIN et al., 2019), sendo adequado tanto para o ajuste de superfícies quadráticas como para a otimização de processos (OTHMAN, et al., 2017; ABBASI et al., 2016; KOUSHA et al, 2015).

Ao Delineamento Composto Central (DCC) em que se adicionam pontos axiais do tipo ±α, em que $\alpha = (2^k)^{1/4}$, denomina-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (RODRIGUES e IEMMA, 2009). O número total de ensaios (N) para o DCCR com k fatores ou variáveis, envolvem 2^k pontos fatoriais com centro na origem (vértices de um cubo); 2k pontos axiais em uma distância fixa (α) do centro, permitindo a estimativa dos termos quadráticos e, repetições nos pontos centrais que possibilitarão o cálculo do erro experimental.

Deste modo, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi selecionado para avaliar o biofilme produzido por *Bacillus* sp. L26 como adsorvente na remoção do corante Rodamina B (RdB) de solução aquosa. Biofilmes consistem de células microbianas emaranhadas em uma matriz de polímeros extracelulares e material particulado que possuem sítios ativos para a adsorção (HUI et al., 2018). Rodamina B é um corante pertencente à classe dos xantenos que tem aplicações no tingimento de tecidos e couros, na indústria de alimentos e em laboratórios biomédicos nos quais é utilizado como corante biológico (BELLO et al., 2020; MOHAMMADI et al., 2010)solution pH (3 to 11. Apesar de seus diversos usos, a Rodamina B é considerada tóxica e mutagênica com diversos efeitos deletérios para os sistemas vivos (TRIPATHY et al., 1995; NESTMANN et al., 1979; TAN et al., 2014).

2 I MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

O corante RdB (fórmula molecular: $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$, massa molecular: 479.01 g mol^{-1}) foi adquirido de Sigma Aldich-Brasil. Uma solução estoque de RdB de 1,0 g L^{-1} em água destilada foi preparada e esta foi diluída para obtenção de soluções utilizadas nos experimentos.

2.2 Preparação do biofilme

Bacillus sp. L26 foi isolado de água subterrânea contaminada por derivados de petróleo. Detalhes do isolamento e identificação desta bactéria foram descritos em nosso trabalho prévio (LIMA et al., 2020)Brazil. Based on hydrocarbon (diesel, hexadecane, benzene, toluene and xylene. Para a formação do biofilme, a linhagem L26 foi inoculada em 50 mL de caldo Nutriente (Himedia, constituído de, por litro: 5,0 g de peptona, 1,5 g de extrato de carne, 1,5 g de extrato de levedura, 5,0 g de NaCl), e incubada à 35 °C por 72 h, em condições estáticas. Após, o biofilme formado na interface ar/meio de cultura foi assepticamente coletado, lavado por três vez com água destilada estéril e liofilizado. O biofilme liofilizado foi armazenado em dessecador até o momento de uso.

2.3 Experimentos de biossorção

Os experimentos de biossorção foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 100 mL contendo 30 mL da solução do corante RdB. A correção do pH das soluções de corante foi efetuada por meio de soluções 0,1 N de NaOH ou HCl. Os fracos foram agitados em shaker rotativo a 150 rpm durante 2 h. Após, o biofilme bacteriano foi removido da solução de corante por centrifugação (10000 rpm, 15 min) e a concentração residual da RdB foi determinada por espectrofotometria UV-Vis (Hach DR6000, λ_{max} = 554 nm). A eficiência de remoção da RdB foi calculada de acordo com a equação (1):

$$R(\%) = \frac{C_i - C_e}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

Em que: C_i e C_e representam a concentração inicial e no equilíbrio da RdB na solução (mg/L).

2.4 Planejamento experimental

O planejamento experimental baseou-se no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização do processo de adsorção do corante Rodamina B.

Os fatores ou variáveis independentes selecionadas para o presente estudo foram pH, concentração de adsorvente (biofilme de *Bacillus* sp. L26), concentração do corante (Rodamina B) e temperatura. A variável dependente considerada como resposta foi a remoção percentual de Rodamina B.

A relação entre a variável dependente e as variáveis independentes pode ser descrita por um modelo de segunda ordem, expressa pela Equação (2):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{14} x_1 x_4 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{24} x_2 x_4 + \beta_{34} x_3 x_4 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{44} x_4^2 \quad (2)$$

Em que: Y é a resposta predita (remoção percentual de Rodamina B, %); x_1, x_2, x_3 e x_4, são as variáveis independentes de entrada codificadas; β_o é o intercepto; β_1, β_2, β_3 e β_4 são os coeficientes lineares; β_{12}, β_{13}, β_{14}, β_{23}, β_{24} e β_{34} são os coeficientes de interação e β_{11}, β_{22}, β_{33} e β_{44} são os coeficientes quadráticos.

As variáveis de entrada foram examinadas em cinco diferentes níveis (-α, -1, 0, 1, α). Os intervalos e níveis utilizados nos experimentos são apresentados na Tabela 1. Todos os experimentos foram delineados utilizando o software livre R (R Core Team, 2017), com a utilização de pacotes específicos para análise estatística e planejamento de experimentos, a saber: o qualityTools (ROTH, 2016) e o DoE.wrapper (GRÖMPING, 2017).

Variáveis	**-α**	**Inferior**	**Central**	**Superior**	**+ α**
	(-2.0)	**(-1.0)**	**(0)**	**(1.0)**	**(2.0)**
x_1, pH	2.00	4.00	6.00	8.00	10.00
x_2, Conc. Adsor (g/L)	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50
x_3, Conc. Corante (mg/L)	10.00	20.00	30.00	40.00	50.00
x_4, Temperatura (°C)	20.00	25.00	30.00	35.00	40.00

Legenda: Conc. Adsor – concentração de adsorvente; Conc. Corante – concentração de corante.

Tabela 1 – Valores utilizados no DCCR para avaliação da remoção de Rodamina B.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados experimentais obtidos para a remoção percentual de Rodamina B bem como os valores preditos e erros são apresentados na Tabela 2.

Ensaios	pH x_1	Conc.Adsor. x_2	Cor.A x_3	Temp. x_4	Remoção de corante (%)		Erro de ajuste	Erro relativo (%)
					Experimental	Predito		
1	4.00	1.00	20.00	25	18.10	15.19	2.92	16.10
2	8.00	1.00	20.00	25	11.50	12.88	-1.38	-12.01
3	*4.00*	*2.00*	*20.00*	*25*	*26.65*	*25.45*	*1.20*	*4.50*
4	8.00	2.00	20.00	25	22.80	23.15	-0.35	-1.52
5	4.00	1.00	40.00	25	14.15	10.45	3.70	26.17
6	8.00	1.00	40.00	25	8.25	8.14	0.11	1.30
7	4.00	2.00	40.00	25	23.00	20.71	2.29	9.94
8	8.00	2.00	40.00	25	17.00	18.41	-1.41	-8.29
9	4.00	1.00	20.00	35	12.10	15.19	-3.08	-25.50
10	8.00	1.00	20.00	35	11.15	12.88	-1.73	-15.52
11	***4.00***	***2.00***	***20.00***	***35***	***28.20***	***25.45***	***2.75***	***9.75***
12	8.00	2.00	20.00	35	23.65	23.15	0.50	2.13
13	4.00	1.00	40.00	35	11.20	10.45	0.75	6.72
14	8.00	1.00	40.00	35	8.80	8.14	0.66	7.47
15	4.00	2.00	40.00	35	19.20	20.71	-1.51	-7.88
16	8.00	2.00	40.00	35	18.20	18.41	-0.21	-1.15
17	6.00	1.50	30.00	30	17.07	17.76	-0.69	-4.04
18	6.00	1.50	30.00	30	20.73	17.76	2.98	14.36
19	6.00	1.50	30.00	30	16.27	17.76	-1.49	-9.16
20	6.00	1.50	30.00	30	17.60	17.76	-0.16	-0.89
21	2.00	1.50	30.00	30	12.60	20.06	-7.46	-59.21
22	10.00	1.50	30.00	30	14.40	15.45	-1.05	-7.31
23	6.00	0.50	30.00	30	8.20	7.49	0.71	8.66
24	*6.00*	*2.50*	*30.00*	*30*	*28.07*	*28.02*	*0.04*	*0.16*
25	6.00	1.50	10.00	30	18.90	18.66	0.24	1.28
26	6.00	1.50	50.00	30	7.64	9.18	-1.54	-20.18
27	6.00	1.50	30.00	20	18.73	17.76	0.98	5.22
28	6.00	1.50	30.00	40	20.00	17.76	2.24	11.22

Tabela 2 – Matriz do delineamento composto central contendo os valores reais para as variáveis, os resultados experimentais e preditos e os desvios para o DCCR.

Pode-se observar uma grande variação do erro relativo em função das combinações das variáveis de entrada. Analisando-se o valor máximo de remoção obtido de 28,20%,

tem-se um erro relativo inferior a 10%. Tal comportamento do erro estará associado às faixas de valores para as variáveis onde o processo de adsorção será facilitado ou não; como será apresentado posteriormente.

Para a obtenção do modelo, consideraram-se apenas os parâmetros significativos, que apresentaram p-valor igual ou inferior a 0,05, apresentados pela Tabela 3. Neste caso, inseriu-se a o termo quadrático para a concentração de Rodamina B (*β33),* no intuito de avaliar sua significância para o modelo, já que apresentou um p-valor de 0.0520. Consoante a Tabela 3; os parâmetros relacionados à interação entre as variáveis no processo de remoção (β_{12}, β_{13}, β_{14}, $\beta_{23,}$ β_{24} e β_{34}) foram não significativos.

Coeficientes	Estimativa do coeficiente	t-valor	p-valor*
β_0	17.917500	15.8576	**0.000000*** **
β_1	-1.152083	-2.4976	**0.026710 ***
β_2	5.132917	11.1276	**0.000000 *****
β_3	-2.369583	-5.1370	**0.000191 *****
β_4	-0.267083	-0.5790	0.572482
β_{12}	0.028125	0.0498	0.961052
β_{13}	0.040625	0.0719	0.943769
β_{14}	0.840625	1.4880	0.160612
β_{23}	-0.840625	-1.4880	0.160612
β_{24}	0.534375	0.9459	0.361460
β_{34}	-0.065625	-0.1162	0.909300
β_{11}	-0.928646	-2.0132	0.065278
β_{22}	0.230104	0.4988	0.626227
β_{33}	-0.986146	-2.1378	**0.052099**
β_{44}	0.537604	1.1655	0.264771

Legenda: * - significativo; *** - altamente significativo.

Tabela 3 – Estimativa dos coeficientes e correspondentes estatísticas para remoção percentual do corante Rodamina B.

Baseando-se nessa análise, fez-se a reparametrização do modelo considerando-se apenas as variáveis independentes significativas (p-valor > 0,05), a saber: pH, concentração do adsorvente e concentração de Rodamina B, com a exclusão da temperatura (p-valor = 0,572). Obteve-se, assim, uma relação entre a remoção percentual do corante e as variáveis independentes analisadas usando o ajuste de um modelo quadrático, expresso pela Equação (3):

$$\% \text{ remoção} = 17.756 – 1,152 \text{ pH} + 5.133 \text{ Cadsor} - 2.369 \text{ Ccor} - 0.959 \text{ Ccor}^2 \quad (3)$$

Em que: pH, Cadsor e Ccor são os valores codificados das variáveis pH, concentração

de adsorvente e concentração de corante.

Valores negativos que antecedem os coeficientes indicam efeitos antagônicos ao processo e valores positivos indicam efeitos de sinergia (ABBASI e HABIBI, 2016). Tais valores podem ser confirmados pelos efeitos principais das variáveis consideradas importantes no processo. Como observa-se na Figura 1, o pH e a concentração de corante apresentam efeitos negativos para o processo de adsorção, reduzindo a porcentagem de remoção com a elevação de seus valores.
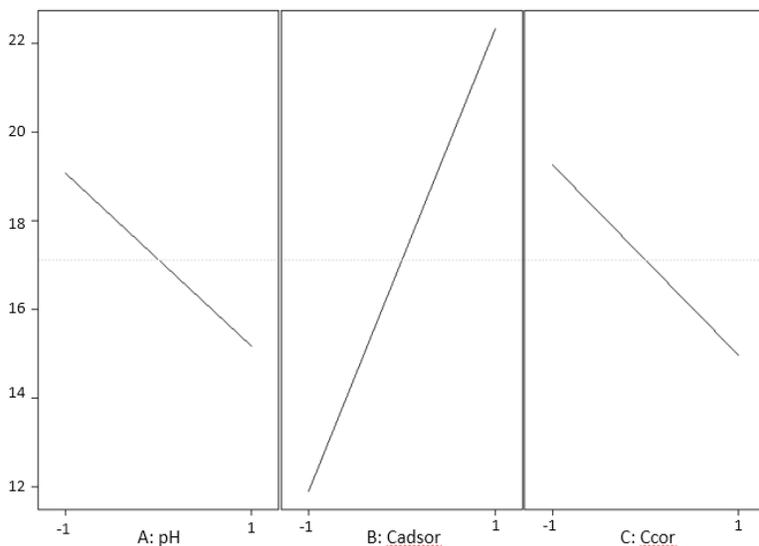
Figura 1 – Gráfico com efeitos principais.

Os valores ótimos para as variáveis de entrada utilizadas foram 4,0 para o pH, 2,0 g/L para a concentração de adsorvente, 20 mg/L para a concentração de corante e 35°C para a temperatura.

A análise de variância (ANOVA) apresentada pela Tabela 4 foi empregada para validar o modelo. O valor calculado de F para o modelo (Fcalc) deve ser superior ao valor tabulado de F, considerando-se o número de graus de liberdade o nível de significância, $\alpha = 5\%$.

O valor de Fcalc para a remoção percentual de corante obtido fora de 35,42, superior ao tabelado de 2,80, indicando o modelo ser altamente significativo (p-valor inferior a 0,00001); confirmando assim a validação do mesmo.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Fcalc
Regressão	824.18	4	291.55	35,42
Resíduos	133.79	23	5.82	
Total	957.97	27		

%remoção: $F_{4,23;0.05}$ = 2.80; R^2 = 0.86, ; R^2ajustado = 0.84, p-valor < 0.00001

Tabela 4 – ANOVA para a remoção percentual de Rodamina B.

A análise de variância (ANOVA) indicou uma porcentagem de variação explicada de 86%. O valor de R^2 indica que esse modelo é adequado para avaliar a remoção percentual de Rodamina B, considerando o pH, a concentração do referido corante e a concentração de adsorvente. Tal resultado pode ser confirmado também pelo gráfico que relaciona dados experimentais e valores previstos (Figura 2).
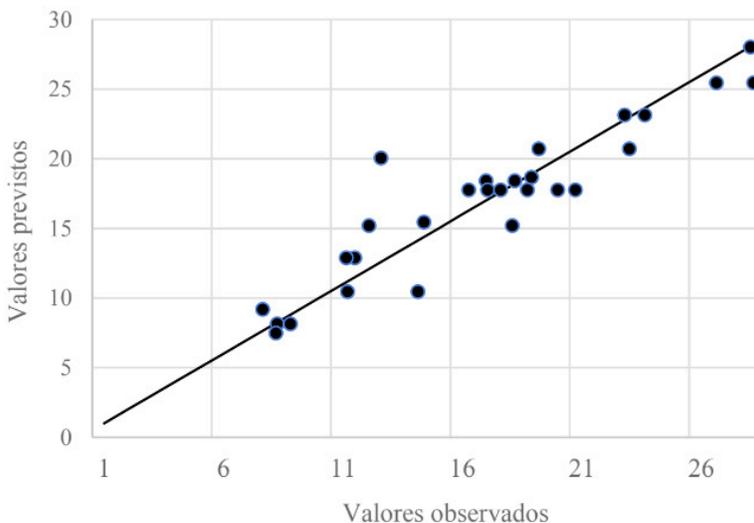
Figura 2 – Gráfico de valores observados por valores preditos.

3.1 Superfícies de resposta e curvas de contorno para a remoção percentual de corante

As superfícies de resposta e curvas de contorno referentes à remoção percentual do corante Rodamina B em função das variáveis independentes, pH, concentração do adsorvente (Cadsor) e concentração de corante (Ccor) são apresentadas nas Figuras 3 a 5.

Na Figura 3 apresenta-se a variação percentual da remoção de Rodamina B em

função da variação do pH e da concentração do adsorvente. Como esperado, quanto maior a concentração do adsorvente maior será a remoção percentual de corante (região em vermelho); notando-se que para o pH a faixa de valores entre 4 e 6 ocasionará a maior remoção.

Já na Figura 4 apresenta-se a remoção percentual de Rodamina B em função do pH e da concentração de corante. Quanto menores forem a concentração de corante e o pH, maior será a remoção percentual. Aqui observa-se um ponto ótimo para a remoção percentual no valor de 20,9 %, quando o pH é igual a 5, e a concentração de corante é de aproximadamente 20 mg/L.

Por fim, na Figura 5, observa-se o comportamento para a remoção percentual em função das concentrações de adsorvente e corante. Como esperado, quanto menor for a concentração de corante e maior for a concentração de adsorvente, maior será a remoção percentual.
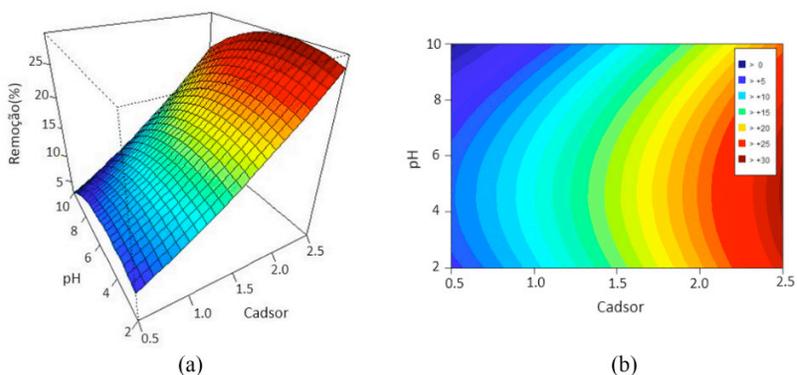
Figura 3 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a remoção percentual de Rodamina B (Remoção %) em função do pH e da concentração de adsorvente (Cadsor).
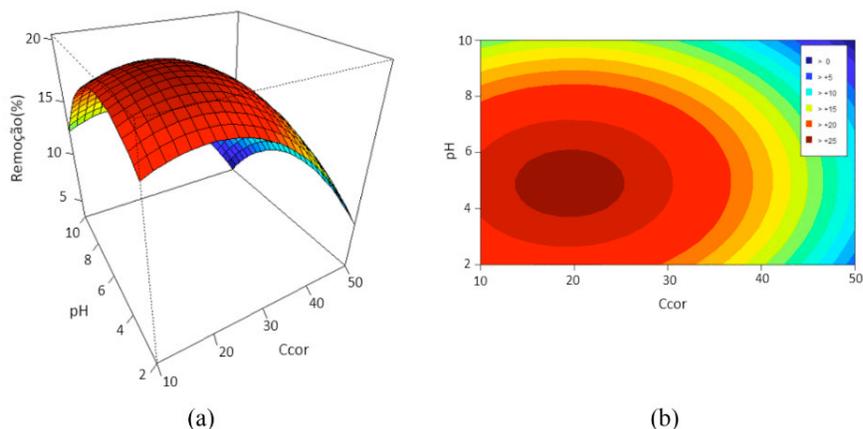
Figura 4 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a remoção percentual de Rodamina B (Remoção %) em função do pH e da concentração de corante (Ccor).
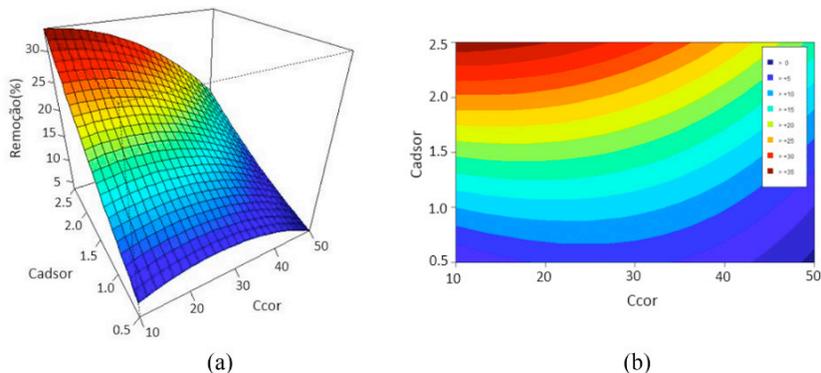
Figura 5 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a remoção percentual de Rodamina B (Remoção %) em função da concentração de adsorvente (Cadsor) e da concentração de corante (Ccor).

4 I CONCLUSÕES

Os ensaios de adsorção iniciais realizados se mostraram promissores para a remoção percentual de corante, obtendo-se o valor máximo de remoção igual a 28,20% para pH no valor de 4,0, concentração de corante igual a 20 mg/L e concentração de adsorvente igual a 2 g/L.

A análise estatística empreendida demonstrou a não significância para a temperatura que fora excluída de modelo. Observou-se também a não interação entre as variáveis estudadas no processo de remoção.

Verificou-se a grande influência do pH sobre a remoção percentual, sendo que valores ótimos de remoção serão obtidos para valores reduzidos de pH.

Para estudos futuros, recomenda-se, a validação experimental, utilizando-se faixas reduzidas para o pH, tão quanto o aumento da concentração de adsorvente na busca da maximização da remoção percentual do corante estudado.

REFERÊNCIAS

ABBASI, M.; HABIBI, M. M. Optimization and characterization of Direct Blue 71 removal using nanocomposite of Chitosan-MWCNTs: Central composite design modeling. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers,** v. 62, p. 112-121, 2016.

AL-MAMUN, M. R. et al. Photocatalytic activity improvement and application of UV-TiO2 photocatalysis in textile wastewater treatment: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 5, 2019.

ALI, M. E. M. et al. Response surface methodology for optimization of the adsorption capability of ball-milled pomegranate peel for different pollutants. **Journal of Molecular Liquids**, v. 250, p. 433–445, 2018.

ARCHIN, S.; SHARIFI, S. H.; ASADPOUR, G. Optimization and modeling of simultaneous ultrasound-assisted adsorption of binary dyes using activated carbon from tobacco residues: Response surface methodology. **Journal of Cleaner Production**, v. 239, p. 1-15, 2019.

BELLO, O. S. et al. Rhodamine B dye sequestration using Gmelina aborea leaf powder. **Heliyon**, v. 6, n. 1, p. e02872, 2020.

BILIŃSKA, L. et al. Coupling of electrocoagulation and ozone treatment for textile wastewater reuse. **Chemical Engineering Journal**, v. 358, n. September 2018, p. 992–1001, 2019.

CASTRO, K. C.; COSSOLIN, A. S.; REIS, H. C. O.; MORAIS, E. B. Biosorption of anionic textile dyes from aqueous solution by yeast slurry from brewery. **Brazilian Archieves of Biology and Technology**, v. 60, p. 1–13, 2017.

CINPERI, N. C. et al. Treatment of woolen textile wastewater using membrane bioreactor, nanofiltration and reverse osmosis for reuse in production processes. **Journal of Cleaner Production**, v. 223, p. 837–848, 2019.

GILL, P. K.; ARORA, D. S.; CHANDER, M. Biodecolourization of azo and triphenylmethane dyes by *Dichomitus squalens* and *Phlebia* spp. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 201–203, 2002.

GRÖMPING, U. The DoE.wrapper Package (Wrapper package for design of experiments functionality). R package version 0.9. In: R Core Team, 2017.

HUANG, Y. et al. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: an acidophile isolated from acid hot spring for the biosorption of heavy metal ions. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, n. 5, p. 2655–2666, 2020.

HUI, C. et al. Removal of nitrite from aqueous solution by *Bacillus amyloliquefaciens* biofilm adsorption. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 146–152, 2018.

KAUR, P.; KUSHWAHA, J. P.; SANGAL, V. K. Electrocatalytic oxidative treatment of real textile wastewater in continuous reactor: Degradation pathway and disposability study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 346, p. 242–252, 2018.

LIMA, S. D. et al. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 2, p. 354–361, 2020.

MOHAMMADI, M. et al. Removal of Rhodamine B from aqueous solution using palm shell-based activated carbon: Adsorption and kinetic studies. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 12, p. 5777–5785, 2010.

MOUSAVI, S. J. PARVINI, M.; GHORBANI, M. Experimental design data for the zinc ions adsorption based on mesoporous modified chitosan using central composite design method. **Carbohydrate Polymers**, v. 188, p. 197-212, 2018.

NATH, J.; RAY, L. Biosorption of Malachite green from aqueous solution by dry cells of *Bacillus cereus* M116 (MTCC 5521). **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, n. 1, p. 386–394, 2015.

NESTMANN, E. R. et al. Mutagenic activity of Rhodamine dyes and their impurities as detected by mutation induction in *Salmonella* and DNA damage in chinese hamster ovary cells. **Cancer Reserach** v. 39, 1979.

OTHMAN, A. M.; ELSAYED, M. A.; ELSHAFEI, A. M. HASSAN, M. M. Application of response surface methodology to optimize the extracellular fungal mediated nanosilver green synthesis. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v. 15, p. 497-504, 2017.

OYEKANMI, A. A. et al. Adsorption of Rhodamine B dye from aqueous solution onto acid treated banana peel: Response surface methodology, kinetics and isotherm studies. **PLoS ONE**, v. 14, n. 5, p. 1–20, 2019.

R CORE TEAM, R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017.

RAHMAN BHUIYAN, M. A. et al. Scope of reusing and recycling the textile wastewater after treatment with gamma radiation. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 3063–3071, 2016.

RIBEIRO, G. A. C. et al. Removal of Remazol brilliant violet textile dye by adsorption using rice hulls. **Polimeros**, v. 27, n. 1, p. 16–26, 2017.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. R. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2ª. Ed. – Campinas, SP: Casa do Espírto Amigo Fraternidade Fé e Amor. 2009.

ROTH, J. Working with the qualityTools package. A short introduction. 2016. Disponível em: <http://www.r-qualitytools.org>.

SHEHZADI, M. et al. Enhanced degradation of textile effluent in constructed wetland system using *Typha domingensis* and textile effluent-degrading endophytic bacteria. **Water Research**, v. 58, p. 152–159, 2014.

SOUZA, F. H. M. et al. Biosorption of Rhodamine B using a low-cost biosorbent prepared from inactivated *Aspergillus oryzae* cells: kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 231, n. 5, 2020.

TAN, D. et al. Rhodamine B induces long nucleoplasmic bridges and other nuclear anomalies in *Allium cepa* root tip cells. **Environmental Science and Pollution Research** p. 3363–3370, 2014.

TRIPATHY, N. K. et al. Genotoxicity testing of two red dyes in the somatic and germ line cells of *Drosophila*. **Food and Chemical Toxicology,** v. 33, n. 11, p. 923–927, 1995.

WATHARKAR, A. D. et al. Treatment of textile effluent in a developed phytoreactor with immobilized bacterial augmentation and subsequent toxicity studies on *Etheostoma olmstedi* fish. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, p. 698–704, 2015.

CAPÍTULO 9

CUSTOS DO TRATAMENTO ANTIMICROBIANO DE PACIENTES INFECTADOS E NÃO INFECTADOS POR MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES

Data de aceite: 19/01/2021
Data de submissão: 30/12/2020

Taylla Rodrigues Chaves
Graduando em medicina pelo Centro Universitário de Brasília (UniCEUB)
Brasília – Distrito Federal (DF)
http://lattes.cnpq.br/8808193278982625

Paula Campos de Mendonça
Graduando em medicina pelo Centro Universitário de Brasília (UniCEUB)
Brasília – Distrito Federal (DF)
http://lattes.cnpq.br/1550653766908713

Gislane Ferreira de Melo
Universidade Católica de Brasília (UCB)
Brasília – Distrito Federal (DF)
http://lattes.cnpq.br/5065099645935473

Tarquino Erastides G Sánchez
Centro Universitário de Brasília (UniCEUB)
Brasília – Distrito Federal (DF)
http://lattes.cnpq.br/6558625198310430

Priscilla Cartaxo Pierri Bouchardet
Mestranda em Ciências e Tecnologias em Saúde pela Universidade de Brasília (UnB)
Brasília – Distrito Federal (DF)
http://lattes.cnpq.br/0035402063718957

Noriberto Barbosa da Silva
Doutor em Educação Física pela Universidade Católica de Brasília (UCB)
Brasília – Distrito Federal (DF)
http://lattes.cnpq.br/3111047844441497

Fabiana Xavier Cartaxo Salgado
Centro Universitário de Brasília (UniCEUB)
Doutora em Ciências e Tecnologias em Saúde pela Universidade de Brasília (UnB)
Brasília – Distrito Federal (DF)
http://lattes.cnpq.br/1737775115488718

RESUMO: Esta pesquisa investigou o custo dos antimicrobianos utilizados no tratamento de pacientes infectados e não infectados por Microrganismos Multirresistentes (MOMR) na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um hospital público. Trata-se de estudo transversal, analítico, retrospectivo e prospectivo, comparativo, de caso controle, que investigou pacientes internados no período de janeiro a dezembro de 2018, no Hospital Regional da Asa Norte - Brasília-DF, com infecção e sem infecção por microrganismos multiresistentes. O número total de pacientes internados na UTI foi 142, e a amostra foi de 40,9% (n=58), estratificados em 75,9% (n=44) de pacientes infectados por MOMR em uso de antimicrobianos e 24,1% (n=14) de pacientes em uso de antimicrobianos e infectados por microrganismos não compatível com multirresistência (N-MOMR). Não foram encontradas diferenças significativas entre idade, sexo, tempo de internação e desfecho clínico entre os grupos. Houve, entretanto, uma maior incidência de óbitos em pacientes infectados por N-MOMR, quando comparado a pacientes infectados por MOMR. O tratamento antimicrobiano de todos os pacientes da amostra resultou em US$ 93.372,5, sendo que o grupo de pacientes infectados por

MOMR tiveram um custo estatisticamente significante, comparado aos pacientes que não apresentaram multirresistência (p=0,015). As classes de medicamentos mais prescritos foram carbapenêmicos, aminoglicosídeos, polimixinas, antifúngicos e glicopeptídeos. Entre as prescrições antibióticas encontradas, 63,7% (n=302) correspondiam aos antibióticos de amplo espectro e foram responsáveis pelo gasto de US$ 85.775,61 o que representou 92% do total de gastos com antimicrobianos. Os principais MOMR encontrados na UTI foram: *Klebsiella pneumoniae* (55,17%), *Acinetobacter baumannii* (16,09%), *Stenotrophomonas maltophilia* (6,90%) e *Pseudomonas aeruginosa* (5,75%). As classes antimicrobianas as quais as bactérias apresentaram maior resistência foram os carbapenêmicos, cefalosporinas de 3ª ou 4°geração e penicilinas inibidoras dos β-lactâmicos. Identificou-se, portanto, um custo estatisticamente mais oneroso no tratamento de pacientes infectados por microrganismos multirresistentes, quando comparado aos pacientes não infectados por essas bactérias.
PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobianos. Custos. Multirresistência.

COSTS OF ANTIMICROBIAL TREATMENT OF PATIENTS INFECTED AND NOT INFECTED BY MULTI-RESISTANT MICRO-ORGANISMS

ABSTRACT: This research investigated the cost of antimicrobials used in the treatment of infected and uninfected patients with Multidrug Resistant Microorganisms (MOMR) in the Intensive Care Unit (ICU) of a public hospital. This is a cross-sectional, analytical, retrospective and prospective, comparative, case-control study that investigated patients hospitalized from January to December 2018, at Hospital Regional da Asa Norte - Brasília-DF, with infection and without infection by microorganisms multiresistant. The total number of patients admitted to the ICU was 142, and the sample was 40.9% (n = 58), stratified by 75.9% (n = 44) of patients infected by MOMR using antimicrobials and 24.1 % (n = 14) of patients using antimicrobials and infected with microorganisms not compatible with multidrug resistance (N-MOMR). No significant differences were found between age, sex, length of stay and clinical outcome between groups. However, there was a higher incidence of deaths in patients infected with N-MOMR, when compared to patients infected with MOMR. Antimicrobial treatment for all patients in the sample resulted in US $ 93,372.5, with the group of patients infected by MOMR having a statistically significant cost, compared to patients who did not have multidrug resistance (p = 0.015). The most prescribed classes of drugs were carbapenems, aminoglycosides, polymyxins, antifungals and glycopeptides. Among the antibiotic prescriptions found, 63.7% (n = 302) corresponded to broad-spectrum antibiotics and were responsible for spending US $ 85,775.61, which represented 92% of the total spending on antimicrobials. The main MOMR found in the ICU were: Klebsiella pneumoniae (55.17%), Acinetobacter baumannii (16.09%), Stenotrophomonas maltophilia (6.90%) and Pseudomonas aeruginosa (5.75%). The antimicrobial classes to which the bacteria showed the greatest resistance were carbapenems, 3rd or 4th generation cephalosporins and β-lactam-inhibiting penicillins. Therefore, a statistically more expensive cost was identified in the treatment of patients infected with multidrug-resistant microorganisms, when compared to patients not infected with these bacteria.
KEYWORDS: Antimicrobials. Costs. Multidrug resistance.

1 | INTRODUÇÃO

A situação crítica da resistência bacteriana motivou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a divulgar uma lista de bactérias resistentes a antibióticos, em 2018, com intuito de evidenciar prioridade nas linhas de pesquisa, descoberta e urgência para desenvolvimento de novos antibióticos principalmente para bactérias de prioridade crítica. Os microrganismos definidos como prioridade crítica para a OMS foram: *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, ambas resistentes a carbapenêmicos. *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenêmicos e à cefalosporinas de terceira geração (TACCONELLI et al., 2018).

As Unidades de Terapia Intensiva (UTI) apresentam uma alta incidência de infecções causadas por bactérias multirresistentes, principalmente pelo uso de procedimentos invasivos, associado à alta carga de antibióticos nesses pacientes (SHARLAND; SAROEY, 2015). Dessa forma, a UTI gera custos elevados, uma vez que a presença de microrganismos multirresistentes eleva os gastos com antibióticos, preparação de medicamentos injetáveis e carga horária de trabalho dos funcionários dos hospitais, além de aumento da permanência hospitalar e da mortalidade (KAYE; POGUE, 2015; SALGADO et al., 2014). As maiores despesas estão relacionadas aos gastos farmacêuticos, seguidas do investimento com a enfermagem e insumos médicos (PUCHTER et al., 2018).

Microrganismos multirresistentes são aqueles resistentes a diferentes classes de antimicrobianos testados em exames microbiológicos; esses microrganismos receberam a alcunha de superbactérias (DE QUEIROZ et al., 2012). Além disso, existem, também, os microrganismos pan-resistentes, que apresentam resistência comprovada in vitro a todos os antimicrobianos testados em exames microbiológicos (SHARLAND; SAROEY, 2015).

Quando se associa o ponto de vista farmacoeconômico à eficácia de um medicamento pode-se determinar um tratamento diferente do que o de costume. Pesquisa realizada no Hospital Clínico da Universidade de Campinas comparou o uso de colistina e polimixina B. A administração da primeira resultou em uma menor taxa de mortalidade, menor nefrotoxicidade, e menor custo no tratamento de uma mesma enfermidade (QUINTANILHA et al., 2019).

Neste sentido torna-se preemente pesquisas que visem colaborar com as equipes e diretrizes hospitalares para instituição de protocolos e programas de redução da incidência de microrganismos multirresistentes nas UTIs, uma vez que os custos relacionados são notórios e dilemas de gastos com a saúde estão sempre presentes em orçamentos governamentais.

A presente pesquisa investigou o custo dos antimicrobianos utilizados no tratamento de pacientes infectados e não infectados por Microrganismos Multirresistentes em uma UTI pública.

2 I MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal, analitico, de caráter retrospectivo e prospectivo, comparativo, de caso controle, realizado na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Regional da Asa Norte (HRAN), da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. Foram investigados o custo dos antimicrobianos utilizados no tratamento de pacientes infectados e não infectados por Microrganismos Multirresistentes internados no período de janeiro a dezembro de 2018.

Os critérios de inclusão foram pacientes internados na UTI, com prescrições de antimicrobianos no ano de 2018, que permaneceram internados por um período superior a 24 horas, e com idade ≥ 18 anos, de ambos os sexos e independente da doença de base e/ou comorbidades presentes ao momento de ingresso ao estudo. Foram excluídos da amostra pacientes que apresentaram todos os exames microbiológicos negativos para a presença de microrganismo; pacientes com resultados positivos para bactérias, mas sem teste de sensibilidade antibiótica (TSA) e, ainda, pacientes em que não foram administrados antimicrobianos.

Os grupos da pesquisa foram estruturados da seguinte forma: Grupo 1 (MOMR) – pacientes internados na UTI em uso de antibioticoterapia e com exames microbiológicos positivos para a presença de microrganismos e correspondente teste de sensibilidade antibiótica compatível com multirresistência. Grupo 2 (N-MOMR) - pacientes internados na UTI em uso de antibioticoterapia e com exames microbiológicos positivos para a presença de microrganismos e correspondente teste de sensibilidade antibiótica "não" compatível com multirresistência.

As variáveis investigadas foram sexo, idade, período de internação, desfecho clínico, antimicrobianos administrados, custo dos antimicrobianos administrados, microrganismos e perfil de sensibilidade encontrados nos materiais biológicos.

Os antimicrobianos foram registrados conforme a Denominação Comum Brasileira – DCB e os custos foram avaliados utilizando-se os preços praticados pela Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, com informações fornecidas pela farmácia do referido hospital. Para o cálculo do custo por antimicrobiano administrado foi utilizado o custo da dose diária em grama multiplicado pelo número de dias em que o medicamento foi administrado.

Os valores monetários encontrados nesta pesquisa foram convertidos ao dólar americano, considerando o valor médio do dólar praticado no ano de 2020 a partir da cotação apresentada pelo Banco Central do Brasil, a fim de facilitar a comparação de custos com tratamento utilizados em outros países.

A identificação dos microrganismos, bem como os dados correspondentes à sensibilidade microbiana foram obtidos no laboratório de microbiologia do hospital a partir do processamento das amostras no equipamento automatizado Walkway da MicroScan

do fabricante Siemens e analisados conforme preconizado pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” ” (NCC, 2004), seguidos de testes de sensibilidade antibiótica (TSA) nos casos das bactérias.

A multirresistência microbiana foi considerada como a cepa bacteriana que apresenta resistência a duas ou mais classes de antibióticos, as quais intrinsecamente deveriam ser suscetíveis (STRUELENS, 1998).

As variáveis de sexo, idade, desfecho clínico, tempo de internação, custo dos antimicrobianos, número de microrganismo multirresistente foram apresentadas de forma descritiva em percentual, frequência, média e desvio padrão.

Todas as análises dos dados foram realizadas com programa Statistical Package of Social Science (SPSS) 23.0. Após análise exploratória foram aplicados os testes de skewness e de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, nas variáveis que não apresentaram normalidade.

Para verificar diferenças significativas nas variáveis de sexo, idade, desfecho clínico, e tempo de internação e nas diferenças de custo de cada antimicrobiano entre o grupo que apresentou multirresistência bacteriana e o grupo que não apresentou multirresistência foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A significância adotada foi de $p<0,05$ e o intervalo de confiança de 95%.

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde/FEPECS/SES/DF e pelo CEP do UniCEUB sob o número de CAAE: 98459218.4.0000.0023.

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número total de pacientes internados na UTI investigada no ano de 2018 foi 142, sendo que os pacientes que fizeram parte da amostra foi 40,9% (n=58), que foram estratificados em 75,9% (n=44) de pacientes infectados por MOMR em uso de antimicrobianos e 24,1% (n=14) de pacientes em uso de antimicrobianos e infectados por N-MOMR. Em adição, 59,1% (n=84) dos pacientes excluídos da amostra apresentaram exames microbiológicos negativos, e/ou exames microbiológicos positivos sem teste de sensibilidade antibiótica.

O perfil epidemiológico dos pacientes da pesquisa encontra-se demonstrado na Tabela 1.

<table>
<tr><th>Variáveis</th><th colspan="3">Pacientes infectados com MOMR (n = 44)</th><th colspan="3">Pacientes infectados com N-MOMR (n = 14)</th><th>P</th></tr>
<tr><td rowspan="2">Sexo</td><td>Feminino</td><td>n = 16</td><td>36,36%</td><td>Feminino</td><td>n = 6</td><td>42,85%</td><td rowspan="2">0,665</td></tr>
<tr><td>Masculino</td><td>n = 28</td><td>63,64%</td><td>Masculino</td><td>n = 8</td><td>57,15%</td></tr>
<tr><td>Idade média±DP</td><td colspan="3">53 (±17,98)</td><td colspan="3">62 (±17,02)</td><td>0,120</td></tr>
<tr><td>Dias de internação (média±DP) mediana</td><td colspan="3">25,02 (±23,72)
18 dias</td><td colspan="3">22 (± 21,67)
13 dias</td><td>0,507</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Desfecho clínico</td><td>Alta</td><td>n = 23</td><td>52,27%</td><td>Alta</td><td>n = 5</td><td>35,71%</td><td rowspan="3">0,456</td></tr>
<tr><td>Óbito</td><td>n = 17</td><td>38,64%</td><td>Óbito</td><td>n = 7</td><td>50%</td></tr>
<tr><td>Transferência</td><td>n = 4</td><td>9,09%</td><td>Transferência</td><td>n = 2</td><td>14,28%</td></tr>
</table>

Tabela 1 – Perfil de sexo, idade, tempo de internação e desfecho clínico dos pacientes infectados por MOMR e pacientes infectados por microrganismos não multirresistentes (N-MOMR)

Não foi encontrado diferença estatística significante entre o primeiro e o segundo grupo considerando as variáveis investigadas. No entanto o sexo masculino foi mais prevalente na amostra conforme documenta a literatura, assim como o tempo de internação prolongado, que igualmente encontra-se relatado, sobretudo quando associada a MOMR (DOS ANJOS et al., 2015; RAKSHIT; OTTA; DEBATA, 2019; LEETHONG, 2019).

No entanto, quando observada as taxas de óbito resultante das internações nesta pesquisa, houve uma maior incidência de óbitos em pacientes infectados por N-MOMR, quando comparado a pacientes infectados por MOMR. Esses resultados, podem ser explicados devido a gravidade dos pacientes do grupo de N-MOMOR, onde 50% apresentavam diagnóstico de choque séptico no momento da internação e evoluíram a óbito nas primeiras 72 horas após a admissão na UTI.

A investigação dos custos dos antimicrobianos prescritos aos pacientes do estudo, bem como o número de prescrições desses fármacos estão expostos na Tabela 2, a qual mostra que o tratamento antimicrobiano de todos os pacientes da amostra resultou no custo de US$ 93.372,5 no decorrer de 2018, sendo que aqueles que apresentaram MOMR tiveram um custo total estatisticamente mais significante, quando comparado aos pacientes infectados por N-MOMR (p=0,015).

Classe antimicrobiana/ Antimicrobianos	Pacientes infectados por MOMR (n=44)		Pacientes infectados por N-MOMR (n=14)		p
	nº prescrições	custo (dólar)	nº prescrições	custo (dólar)	
Aminoglicosídeos					
Amicacina	43	452,17	8	65,42	0,271
Gentamicina	16	81,11	6	15,28	0,746
Inibidor de β lactamase					
Ampicilina/sulbactam	4	88,66	0	0.00	-
Piperacilina/ tazobactam	5	366,34	4	162,82	0,902
Cefalosporina					
Cefazolina	2	1,56	0	0.00	-
Ceftazidima	1	8,37	0	0.00	-
Ceftriaxona	3	3,16	0	0.00	-
Cefepime	11	205,68	4	88,44	0,801
Quinolonas					
Ciprofloxacino	5	201,83	1	14,41	0,766
Levofloxacino	2	9,72	0	0.00	-
Moxifloxacino	0	0.00	1	18,42	-
Lincosamida					
Clindamicina	5	51,42	6	54,5	0,286
Cabapenêmicos					
Imipenem	3	257,95	0	0.00	-
Meropenem	72	16.247,42	16	2.088,77	0,052
Ertapenema sódico	8	5.646,40	0	0.00	-
Sulfonamidas					
Trimetropina e sulfametoxazol	9	414,35	1	4,14	0,12
Glicopeptídeos					
Vancomicina	41	1.780,61	5	129,71	0,253
Teicoplamina	1	68,55	0	0.00	-

Oxazolidinona					
Linezolida	8	1.424,84	1	144,9	0,272
Antifúngicos					
Fluconazol	16	105,93	6	43,11	0,385
Acetato de caspofungina	0	0.00	0	0.00	-
Anidulafungina	30	8.540,08	8	1.249,77	0,305
Anfotericina B Complexo lipídico	4	699,42	0	0.00	-
Anfotericina B Lipossomal	3	14.957,35	0	0.00	-
Voriconazol	0	0.00	0	0.00	-
Nistatina	0	0.00	1	8,15	-
Penicilinas					
Ampicilina	0	0.00	1	24,68	-
Benzilpenicilina	1	1,66	0	0.00	-
Oxacilina	1	16,64	0	0.00	-
Glicilciclina					
Tigecilcina	4	13.650,92	0	0.00	-
Lipopeptídeo					
Daptomicina	8	4.767,65	1	248,32	0,377
Macrolídeo					
Azitromicina	6	105,59	2	18,98	0,049
Outros					
Polimixina B	57	16.731,02	15	2.023,88	0,151
Colestimetato sódico	0	0.00	0	0.00	-
Metronidazol	14	97,25	2	2.42	1,82
Total	382	US$86.967,00	92	US$6.405,50	0,015

Tabela 2. Custos das terapias antimicrobianos utilizadas em pacientes infectados por microrganismos multirresistentes (MOMR) e pacientes infectados com microrganismos não multirresistentes (N-MOMR) internados na Unidade de Terapia Intensiva.

As classes de medicamentos mais prescritos foram os carbapenêmicos, aminoglicosídeos, polimixinas, antifúngicos e glicopeptídeos. Entre as prescrições antibióticas encontradas, 63,7% (n=302) correspondiam aos antibióticos de amplo espectro

e foram responsáveis pelo gasto de US$ 85.775,61 o que representou 92% do total de gastos com antimicrobianos.

Em relação ao custo do tratamento com antimicrobianos dos pacientes que receberam alta por melhora clínica, o grupo dos infectados por N-MOMR (n=5) foi de US$ 1.518,81 enquanto o custo com os infectados por MOMR (n=23) foi de US$ 66.945,73. Dos pacientes que foram a óbito, no grupo dos infectados por N-MOMR (n=7) houve um gasto total com os antimicrobianos de US$ 8.237,67 e os infectados por MOMR com este mesmo desfecho (n=17) gastaram US$27.210,72. O valor de US$35.448,39, gastos com antimicrobianos em pacientes que foram ao óbito, representou 38% do total dos gastos.

A diferença de custo entre os grupos de MOMR e os N-MOMR deve-se, também, aos tipos de antimicrobianos utilizados. Exemplificando, o preço unitário da anfotericina B lipossomal custa US$311,62; a daptomicina, US$49,66; e o ertapenem, US$58,82. Tanto o ertapenem quanto as anfotericinas foram utilizadas somente no grupo infectado por MOMR. Já a daptomicina, embora administrada nos dois grupos, teve maior número de prescrições no grupo de MOMR. O que contribui para a diferenças de despesas entre os dois grupos.

Cabe ressaltar que não se levaram em conta os custos advindos do preparo das doses de medicamentos injetáveis e demais materiais envolvidos no processo, que oneram ainda mais os custos na administração desses medicamentos.

Apenas dois medicamentos (meropenem e azitromicina) apresentaram diferença significativa em relação aos custos quando analisados os dois grupos (MOMR e N-MOMR), o que sugere que o perfil dos demais antimicrobianos utilizados nos dois grupos foram semelhantes.

A microbiota encontrada na UTI foi estratificada em MOMR (n=87) onde as seguintes bactérias representaram 83,91% (n=73): *Klebsiella pneumoniae* (55,17%), *Acinetobacter baumannii* (16,09%), *Stenotrophomonas maltophilia* (6,90%) e *Pseudomonas aeruginosa* (5,75%). Ressaltamos que as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* encontradas nesta pesquisa expressaram resistência aos carbapenêmicos, e a enterobactéria *Klebsiella pneumoniae* apresentou completa resistência aos β-lactâmicos, cefalosporinas de 3ª ou 4°geração, penicilinas com inibidores de beta lactamases e os carbapenêmicos. Estes achados confirmam a importância do foco da OMS considerando a *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii,* como prioritários na vigilância hospitalar, por apresentarem maior prevalência de cepas multirresistentes aos antimicrobianos (FOUNOU et al., 2017; TACCONELLI et al., 2018).

Os recursos financeiros empregados no tratamento antimicrobiano em infectados por MOMR vêm sendo descritos como maiores, quando comparados ao tratamento de pacientes infectados por microrganismos não multitresistentes, para espécies como a *Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanni e Pseudomonas aeruginosa,* corroborando com o que encontramos nesta pesquisa (PUCHTER et al., 2018).

A presente pesquisa revelou uma alta incidência de MOMR, haja vista a grande

diferença entre o número de pacientes infectados por estes microrganismos quando comparado ao grupo de pacientes com infecção por microrganismos não multirresistentes.

4 I CONSIDERAÇÕES FINAIS

Corroborando com a literatura já apresentada, observou-se um elevado custo com tratamentos antimicrobianos na UTI do hospital investigado, ressaltando os pacientes infectados por microrganismos multirresistentes. Ademais, as espécies mais prevalentes e que resultaram em recursos financeiros mais amplos para o tratamento das infecções por elas provocadas foram a *Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanni, Stenotrophomonas maltophilia e Pseudomonas aeruginosa.*

As classes antimicrobianas as quais as bactérias apresentaram maior resistência foram os carbapenêmicos, cefalosporinas de 3ª ou 4°geração e penicilinas com inibidores de β-lactamases. Em adição, as classes de antimicrobianos mais prescritos foram os carbapenêmicos, polimixinas, glicopeptídeos, aminoglicosídeos e antifúngicos. Ressaltando ainda o uso de antibióticos de amplo espectro.

Sumarizando, os pesquisadores envolvidos neste estudo concluem que as consequências provocadas pelos microrganismos multirresistentes recaem sobre os pacientes, com a ameaça de falências terapêuticas cada vez mais frequentes, devido aos inócuos tratamentos anti-infecciosos, resultantes do aumento da resistência bacteriana. Esse contexto repercute tanto na saúde individual quanto coletiva da população, por demandar recursos financeiros cada vez maiores, ameaçando um retorno à era pré-antibiótica, com consequente aumento do sofrimento humano.

REFERÊNCIAS

BASSO, Maria Emilha et al. **Prevalência de infecções bacterianas em pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva (UTI).** RBAC, v. 48, n. 4, p. 383-8, 2016.

DE QUEIROZ, Geisiany Maria et al. **Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis**. Rev Bras Clin Med. São Paulo, v. 10, n. 2, p. 132-8, 2012.

DOS ANJOS, Rosana Maria Paiva et al. **Letalidade hospitalar por bactérias multiresistentes em serviço do SUS, região de Sorocaba, São Paulo, Brasil**. Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba, v. 17, n. Supl., 2015.

FOUNOU, Raspail Carrel; FOUNOU, Luria Leslie; ESSACK, Sabiha Yusuf. **Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis**. PloS one, v. 12, n. 12, p. e0189621, 2017.

KAYE, Keith S.; POGUE, Jason M. **Infections caused by resistant gram-negative bacteria: epidemiology and management.** Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, v. 35, n. 10, p. 949-962, 2015.

LEETHONG, Pornvimol. **Hospital Acquired Pneumonia and Ventilator Associated Pneumonia in Adults at SamutprakarnHospital: Etiology Clinical outcomes and Impact factors of Antimicrobial Resistance**. Region 11 Medical Journal 11, v. 33, n. 2, p. 181-196, 2019.

PUCHTER, Laura et al. **Economic burden of nosocomial infections caused by vancomycin-resistant enterococci**. Antimicrobial Resistance & Infection Control, v. 7, n. 1, p. 1, 2018.

QUINTANILHA, Júlia Coelho França et al. **Colistin and polymyxin B for treatment of nosocomial infections in intensive care unit patients: pharmacoeconomic analysis**. International journal of clinical pharmacy, v. 41, n. 1, p. 74-80, 2019.

RAKSHIT, Anindita; OTTA, Sarita; DEBATA, Nagen Kumar. **Aerobic bacteriological profile of ventilator-associated pneumonia: a hospital-based study in Bhubaneswar, Orissa, India**. International Journal of Scientific Research, v. 8, n. 4, 2019.

SALGADO, Fabiana Xavier Cartaxo et al. **Evaluation of rational use of antimicrobial agents in a Brazilian intensive care unit**. Health, v. 6, n. 02, p. 188, 2014.

SHARLAND, Mike; SAROEY, Praveen; BEREZIN, Eitan Naaman. **The global threat of antimicrobial resistance-The need for standardized surveillance tools to define burden and develop interventions**. *Jornal de pediatria*, 2015, 91.5: 410-412.

STRUELENS, Marc J. **The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital acquired infections: problems and possible solutions**. Bmj, v. 317, n. 7159, p. 652-654, 1998.

TACCONELLI, Evelina et al. **Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis**. The Lancet Infectious Diseases, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.

CAPÍTULO 10

DIVERSIDADE DE FUNGOS ZOOSPÓRICOS EM AREAS DE PRESERVAÇÃO DA REGIÃO METROPOLITANA DE MANAUS-AM

Data de aceite: 19/01/2021

Eliane Santos Almeida
Acadêmica do curso de Ciências Biológicas ICB da Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
http://lattes.cnpq.br/7704064563815295

Maria Ivone Lopes da Silva
Docente do ICB da Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
http://lattes.cnpq.br/4169112948312043

RESUMO: Fungos são organismos pertencentes ao Reino Fungi, heterotróficos, podendo ser sapróbios ou parasitas de plantas e animais, que conseguem se distribuir por diversos tipos de ambientes até mesmo com condições restritas a determinados seres vivos. Esses ambientes por sua vez, podem ser favoráveis a determinadas espécies sendo terrestres ou aquáticos como, é o caso dos fungos zoospóricos (aquáticos), fungos que são frequentemente encontrados em ambiente com bastante volume de água ou com grande umidade (Pereira, 2008). Quanto a esses organismos ainda são poucos os trabalhos desenvolvidos quanto a sua distribuição, sendo de fundamental importância estudos acerca de tais seres vivos. Portanto foi realizado o levantamento da diversidade de fungos zoospóricos através de coletas de amostras de água e solo de igarapés da “Reserva Particular do Patrimônio Natural RPPN- Sítio Bons Amigos”, e processados conforme métodos de iscagem múltipla de MILANEZ & BENEKE (1968). Na pesquisa foram identificados 43 táxons, para o Reino Fungi foram 27, distribuídos em 15 gêneros, sendo *Blastocladia* e *Catenophlyctis* do filo Blastocladiomycota, onde a espécie *Blastocladia globosa* tem sua primeira citação para o Amazonas, já tendo sido descrita em outros estados como, por exemplo, São Paulo. Para o Filo Chytridiomycota foram identificados: *Catenochytridium*, *Chytriomyces*, *Cladochytrium*, *Diplophlyctis*, *Enthophlyctis*, *Gonapodia*, *Karlingia*, *Karlingiomices*, *Nowakowskiella*, *Podochytrium* e *Rhizophydium* O gênero que mais ocorreu foi *Rhizophydium*, sendo a espécie *Rhizophydium sphaerotheca*, a mais abundante aparecendo em todas as amostras da primeira coleta. As espécies mais rara foram: *Catenochytridium kevorkiani* e *Karlingia chitinophyla*. No Reino Chromista, Filo Oomycota foram identificados 15 táxons distribuídos por 6 gêneros: *Achlya*, *Aphanomyces*, *Brevilegnia*, *Dictiuchus, Leptolegniella* e *Pythiogeton*, sendo o gênero mais frequente *Aphanomyces,* sendo a espécie *Aphanomyces irregulare* com seis ocorrências entre água e solo. Entre as espécies menos frequentes, destacam-se: *Aphanomyces helicoides*, *Dictiuchus pseudoachliodes, Dictiuchus sterile* e *Leptolegniella keratinophyla*. *Zoophagus insidians*, representante do Filo Zigomycota adaptado ao ambiente aquático, também foi identificado em duas amostras da primeira coleta. Os resultados obtidos possibilitam perceber a diversidade de fungos aquáticos existentes na Reserva sendo um acréscimo ao conhecimento na área, levado em conta à quantidade recursos ainda a serem estudados, aumentando assim a amplitude de

conhecimento acerca do ecossistema na Região Amazônica.

PALAVRAS-CHAVE: Zoospóricos, água, solo e áreas preservadas.

DIVERSITY OF ZOOSPORIC FUNGI IN PRESERVATION AREAS OF THE METROPOLITAN REGION OF MANAUS-AM

ABSTRACT: Fungi are heterotrophic organisms belonging to the Fungi Kingdom, which may be saprobes or parasites of plants and animals, which are able to distribute themselves in different types of environments even with conditions restricted to certain living beings. These environments, in turn, can be favorable to certain species, whether terrestrial or aquatic, as is the case of zoosporic (aquatic) fungi, fungi that are often found in environments with a high volume of water or with high humidity (Pereira, 2008). As for these organisms, there are still few works developed regarding their distribution, and studies about such living beings are of fundamental importance. Therefore, a survey of the diversity of zoosporic fungi was carried out by collecting water and soil samples from streams of the "Reserva Particular do Patrimônio Natural RPPN- Sítio Bons Amigos", and processed according to MILANEZ & BENEKE (1968) multiple baiting methods. In the research 43 taxa were identified, for the Fungi Kingdom there were 27 distributed in 15 genera, being *Blastocladia* and *Catenophlyctis* from the phylum Blastocladiomycota, where the species *Blastocladia globosa* is its first citation for Amazonas, having already been described in other states like São Paulo. For the Phylum Chytridiomycota were identified: *Catenochytridium, Chytriomyces, Cladochytrium, Diplophlyctis, Enthophlyctis, Gonapodia, Karlingia, Karlingiomices, Nowakowskiella, Podochytrium* and *Rhizophydium*. The genus that most occurred was *Rhizophydium*, with *Rhizophydium sphaerotheca* being the most abundant species appearing in all samples from the first collection. The rarest species were: *Catenochytridium kevorkiani* and *Karlingia chitinophyla*. In the Chromist Kingdom, Filo Oomycota, 15 taxa were identified, distributed in 6 genera: *Achlya*, *Aphanomyces*, *Brevilegnia, Dictiuchus, Leptolegniella* and *Pythiogeton*, being the most frequent genus *Aphanomyces*, being the species *Aphanomyces irregulare* with six occurrences between water and soil. Among the less frequent species, the following stand out: *Aphanomyces helicoides, Dictiuchus pseudoachliodes, Dictiuchus sterile* and *Leptolegniella keratinophyla*. *Zoophagus insidians*, representative of the Phylum Zigomycota adapted to the aquatic environment was also identified in two samples from the first collection. The results obtained make it possible to perceive the diversity of aquatic fungi that exist in the Reserve, adding to the knowledge in the area, taking into account the amount of resources yet to be studied, thus increasing the breadth of knowledge about the ecosystem in the Amazon Region.

KEYWORDS: Zoosporic, water, soil, preserved area.

1 I INTRODUÇÃO

No decorrer dos últimos anos se registrou uma ampliação de atividades realizadas com o intuito principal de conhecer melhor os organismos existentes em nossos ecossistemas. A busca por melhorias na saúde ou em fatores econômicos tem sido o foco principal de diversos cientistas. Além disso, a preocupação com áreas de preservação

ambiental e seus recursos biológicos também tem sido o foco de estudos realizados nos últimos anos, mesmo que em um número pouco significativo. Atrelado a isso, estudos com a diversidade de microrganismos têm recebido maior atenção nos últimos tempos. Dentre outros, um dos mais estudados são os fungos, organismos pertencentes ao Reino Fungi e Reino Chromista, que podem habitar diversos ambientes, este que, por sua vez, pode ser terrestre, aéreo (Anemófilos) ou até mesmo aquático (zoospóricos) segundo (Pereira, 2008).

Quando se tratando de fungos pertencentes ao ambiente aquático, há a concentração de estudos por parte de profissionais em Engenharia da Pesca ou piscicultores, já que em dados momentos, podem acabar se deparando com problemas causados por este tipo de fungo, que são um dos principais geradores de prejuízos na piscicultura, por meio do parasitismo em peixes (Stempniewski, 1970).

Os fungos aquáticos se diferem dos demais fungos, principalmente, por conta do ambiente em que estão, em grande parte, inseridos. Podem ser encontrados em ambientes totalmente aquáticos ou terrestres, desde que, extremamente ou parcialmente úmidos, portanto suas condições morfológicas exigem certas especiações em relação às presentes nos demais fungos (Alexopolus *et all.,* 1996).

A micota aquática é em sua maioria zoospórica (Chytridiomycota), ou seja, é um grupo de fungos aquáticos, seus principais representantes pertencem aos filos Oomycota (reino Chromista antigo (Stramenopila) e Chytridiomycota ao (reino Fungi) que foi atualmente dividido em mais um filo, o Blastocladiomycota (Milanez et al. 2007; Nascimento et al. 2011*),* (Pires-Zottarelli, 2012). Oomycota difere de Chytridiomycota por apresentar zoósporos dotados de dois flagelos, sendo um penado e um liso, enquanto que Chytridiomycota apresenta um flagelo liso (Costa, 2010). Essa característica está intimamente ligada com a locomoção dos esporos desses seres, que por se encontrarem em ambientes aquáticos precisam nadar para garantir maior otimização em sua reprodução (Kirk et al. 2008).

Existem também representantes dos outros grupos/filos (Zygomycota, Deuteromycota, Ascomycota e Basidiomycota). (Pires - Zottarelli, 1990, Dudka, 1994). Fungos (zoospóricos) apresentam, assim como os demais, reprodução assexuada e sexuada gerando esporos em pelo menos uma fase do seu ciclo reprodutivo, segundo afirma (Moreira & Schoenlein-Crusius, 2010).

Os fungos aquáticos necessitam de certas atribuições que possam conferir uma maior locomoção e consequentemente reprodução eficiente nesse tipo de ambiente, desta forma uma característica morfológica bastante importante é o flagelo, que constitui a principal diferença dos demais fungos. Nesses fungos, os esporos produzidos são flagelados conferindo uma especialização essencial para vida aquática desses organismos (Pires Zotarelli, 2012).

Os fungos zoospóricos podem ser encontrados em diversos tipos de ambientes aquáticos, diante da grande quantidade de recursos hídricos do país, principalmente na

região amazônica, trabalhos foram realizados e se conseguiu encontrar diversas espécies de fungos aquáticos, facilitando a compreensão acerca do desenvolvimento e a reprodução desses seres vivos. Esses por sua vez apresentam em sua estrutura flagelos móveis, reprodução sexuada (gametângios) ou assexuada (zoosporângios), sua parede celular é composta basicamente por quitina, porém, alguns podem apresentar celulose (Pereira, 2008). Seu hábito é bastante diversificado podendo ser sapróbios em plantas e insetos, parasitas de algas marinhas e marrons, de água doce e fungos aquáticos (Alexopoulos et al, 1996).

Quando se tratando da importância dos fungos aquáticos, em tal ambiente eles podem estar inseridos em uma ampla lista, são de fundamental importância, por exemplo, para decomposição de matéria orgânica, podem ser indicadores de qualidade da água, e terem influência também em ciclos de vida de organismos grandes e pequenos como, crustáceos, insetos aquáticos e ou peixes. Como às bactérias, os fungos aparecem frequentemente em peixes causando infecções secundárias como é possível confirmar em (Stempniewski, 1970).

Mesmo que trabalhos já tenham sido realizados por todo o Brasil (Pires - Zottarelli, 1990, Cavalcanti, 2000, Rocha, 2001, Silva, 2002) muito ainda se tem a estudar, a fim de, reforçar ainda mais o conhecimento da biodiversidade de organismos aquáticos brasileiros, de modo também que posteriormente possa ser realizado um levantamento dos efeitos que podem estar levando a diminuição ou aumento de certas espécies fúngicas em dadas regiões. Na Amazônia brasileira alguns estudos já foram iniciados na década de 40, porém com a intenção de aprofundar os conhecimentos acerca de qual seria a variedade de espécies de organismos zoospóricos existentes na região, ainda é bastante escasso. Entretanto são poucos ainda os trabalhos que apontam como foco principal essa situação em áreas de preservação se comparados com a extensão de recursos hídricos existentes na Amazônia. (Silva, 2002; Pinto e Silva, 2009; Utumi, 2010; Porto e Silva, 2011, Ferreira, 2013, Paiva, 2013, Neto, 2020; Barthelemy e Silva 2020).

Desse modo, esse trabalho teve como objetivo realizar um levantamento da diversidade de organismos zoospóricos existentes em igarapés em área preservadas (RPPN) do município de Manaus-AM.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo/ local de coleta

As coletas da pesquisa foram realizadas na (Reserva Particular do Patrimônio Natural- RPPN)- Sítio Bons Amigos (“02º 50 33” , 06º 04’ 04”) w BR-174, também conhecida por Manaus–Boa Vista.

Figura 1. Local das coletas, (Reserva Particular do Patrimônio Natural- RPPN- Sítio Bons Amigos)-(A-B). Dois dos pontos que foram utilizados para as coletas (C-D). Manaus-AM

As mesmas foram realizadas em diversos pontos dos igarapés selecionados (8), em diferentes ambientes, no mês de setembro de 2019 (1ª. coleta), quanto a (2ª. coleta) no mês de março 2020, nos mesmo pontos da primeira. Em cada ponto selecionado foram recolhidas alíquotas de água (em torno de 100 mL em vidros previamente esterilizados e etiquetados) e solo (±300g) das margens em sacos plásticos novos e etiquetados. Após coleta do material a temperatura e o pH foram mensurados e as amostras encaminhadas para o Laboratório de Fungos Aquáticos/ICB/UFAM onde foram processadas.

2.2 Técnicas para isolamento dos fungos zoospóricos de água e solo

As amostras coletadas de água e solo receberam preparação conforme métodos preconizados por SPARROW (1960) e SCOTT (1961) in MILANEZ & BENEKE (1968) que consiste na iscagem múltipla com substratos citados a seguir: sementes previamente esterilizadas de sorgo (*Sorghum* sp.), ecdise de cobra, exoesqueleto de camarão, palha de milho, celofane, epiderme de cebola, além de fragmentos de cabelo loiro e também grãos de pólen. As amostras distribuídas em placas de Petri foram incubadas à temperatura ambiente por aproximadamente 7 a 15 dias sendo reidratadas com água destilada periodicamente. Após desenvolvimento das colônias, em torno dos substratos (iscas), estas foram analisadas sobre microscópia óptica, e verificadas suas características morfológicas, para identificação dos organismos desenvolvidos e em seguida re-inoculadas com novos substratos.

Os fungos que produziram micélio cenocítico foram isolados em meio de cultura (MP5 (maltose-peptona-Agar) ou CMA +p.p.e. (Corn-meal–Agar acrescido dos antibióticos penicilina e estreptomicina), e em seguida ao seu crescimento, reinoculados em placa estéril contendo iscas apropriadas e água destilada estéril.

2.3 Identificação dos fungos isolados

As identificações dos fungos zoospóricos observados, foram realizadas através de exames de característica microscópicas dos fragmentos do substrato desenvolvidos, montados sobre lâmina e lamínula, utilizando-se água destilada.

Para o estudo e identificação dos fungos zoospóricos, foram utilizados entre outros, os seguintes trabalhos: SPARROW (1960), KARLING (1977), ALEXOPOULOS et al. (1996), DICK (1976) e JOHNSON et al. (1956), COSTA (2010), PEREIRA (2008), KIRK (2008),

HIROHARU (1940) e BARTHELEMY e SILVA (2020).

2.4 Preservação dos fungos

Após identificação, os fungos nos fragmentos de iscas foram preservados em água destilada estéril ou montados em lâmina com corante e armazenados em caixas para posterior realização de fotografias e para futuros estudos.

3 | FATORES AMBIENTAIS

1 Temperatura- Para determinação da temperatura do solo e da água foram utilizados termômetros, no momento da coleta.

2. pH - O pH das amostras de água foi determinado no momento da coleta por meio de pHmetro manual.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o desenvolvimento dos organismos nas amostras de água e solo dentro das placas de Petri os resultados finais obtidos foram: 30 espécies distribuídas por 21 gêneros. Destas, 20 distribuídas em 14 gêneros pertencentes ao Reino Fungi, Filos Chytridiomycota e Blastocladiomycota e 9 em 6 gêneros pertencentes ao Reino Chromista, Filo Oomycota. Um representante pouco comum do Filo Zygomycota adaptado no ambiente aquático também foi encontrado (*Zoophagus insidians*), (Tab.1).

Fungi

Blastocladiomycota

Em um contexto mais amplo Blastocladiales são fungos que possuem talo eucárpico, cenocítico, diferenciado em rizoides para fixação, célula basal geralmente bem diferenciada que pode possuir, na sua extremidade distal, túbulos e/ou segmentos hifálicos e/ou estruturas de reprodução sexuada e assexuada.

Blastocladia

Blastocladia globosa (Kanouse, 1927). Kanouse, Am. J. Bot. 14:298.1927

Possui registro de ocorrência em São Paulo entre outros.

Descrição: Quanto a espécies *Blastocladia globosa* essa pode apresentar: Talo ovoide e conspícuo. Célula basal globosa até 210 µm diâmetro. Zoosporângio cilíndricos, longo-clavados, 60-200x20-65 um, por vezes decíduos, deixando cicatrizes na célula basal. Zoospóros esféricos. Esporângio de resistência ovoide, ápice arredondado e base truncada, parede espessa, conteúdo marrom-escuro, 20-45 x 18-35 µm. Sistema rizoide pouco desenvolvido.

Material examinado: Amostras de água, isca de semente de sorgo.

Catenophlyctis variabilis (Karling) Karling, Am. J. Bot. 52: 134. 1965.

Basiônimo: *Phlyctorhiza variabilis* Karling, Am. J. Bot. 34: 27. 1947.

Descrição: Nascimento & Pires-Zottarelli (2010).

Material examinado: Amostra de água e solo, isca de ecdise de cobra.

Possui registro de ocorrência no Amazonas, Piauí, Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo.

Essa espécie caracteriza-se pela presença de zoosporângios inoperculados de tamanhos e formas muito variáveis, organizados radialmente em um rizomicélio muito ramificado, o que foi confirmado nos espécimes dessa pesquisa, concordando com a descrição original de Karling (1965). Foi possível constatar que o crescimento dessa espécie foi, saprofítico, restrito ao substrato queratinoso, isca de ecdise de cobra, corroborando as citações de Karling (1946, 1947a), Milanez (1984) e Pires-Zottarelli & Rocha (2007).

Chytridiomycota

Chytriomyces hyalinus Karling, Am. J. Bot. 32: 363. 1945.

Descrição: Nascimento & Pires-Zottarelli (2009).

Material examinado: Amostras de água e solo iscas de ecdise de cobra e exoesqueleto de camarão. Possui registro de ocorrência no Amazonas, Piauí, Minas Gerais, São Paulo.

Podendo apresentar zoosporângios operculados, apofisados ou não, e zoósporos com uma gotícula lipídica hialina caracterizam esta espécie. Foi isolada em substrato quitinoso, exoesqueleto de camarão, concordando com Karling (1945a) e Pires-Zottarelli & Rocha (2007), além de substrato queratinoso e ecdise de cobra.

Chytriomyces spinosus Fay, Mycologia 39: 152. 1947.

Descrição: Nascimento & Pires-Zottarelli (2009).

Material examinado: Amostra de água e solo, iscas de milho e celofane.

Possui registro de ocorrência no Amazonas, Piauí, São Paulo.

A principal característica da espécie é a presença de zoosporângios operculados, não apofisados, apresentando ornamentações em forma de espinhos agudos e não bifurcados, que foi nitidamente observado nos espécimes analisados. Apresentou crescimento apenas em substrato celulósico, celofane e palha de milho, concordando com a descrição original de Fay (1947). *Chytriomyces spinosus* foi isolada pela primeira vez no Brasil por M.I.L. Silva, em amostras de água e solo coletadas em Manaus (AM) (Milanez *et al.* 2007).

Cladochytrium hialinus Karling. Amer. J Bot. 32.36.3.1945

Material examinado: Amostra de solo, isca de cebola.

Possui registro no Amazonas em São Paulo entre outros. Pode apresentar talo eucárpico, monocêntrico, extra e/ou intramatrical. Zoosporângios operculados,\ hialinos, esféricos, parede lisa. Apófise sub-esporangial presente ou ausente. Liberação dos zoosporângios é por meio de opérculo localizado apical ou subapicalmente nos

zoosporângios. Zoósporos encistados, com uma gotícula lipídica (Berdan, 1941).

Cladochytrium replicatum Karling, Amer. J. Bot. 18: 538. 1931.

Descrição: Nascimento & Pires-Zottarelli (2009).

Material examinado: Amostras de água e solo, iscas de palha de milho, epiderme de cebola ecdise de cobra e celofane.

Possui registro de ocorrência no Amazonas, Piauí, Ceará, São Paulo, entre outros.

Diplophlyctis sarcoptoides (H. E. Petersen) Dogma Jr., Nova Hedwigia 25: 122. 1974.

Basiônimo: *Asterophlyctis sarcoptoides* H. E. Petersen, J. Bot. 17: 218. 1903.

Descrição: Nascimento & Pires-Zottarelli (2009).

Material examinado: Amostras de água e solo, iscas de ecdise de cobra e exoesqueleto de camarão. Possui registro de ocorrência no Amazonas, Rondônia, Minas Gerais, São Paulo.

Esta espécie se caracteriza pela formação de zoosporângios inoperculados e apofisados, com ornamentações tuberculadas, espinhosas ou papiladas, e esporos de resistência apofisados, apresentando ornamentações semelhantes às do zoosporângio, facilmente visualizadas nos espécimes isolados, que foram observados crescendo em substrato quitinoso, exoesqueleto de camarão, o que concorda com Dogma Jr. (1974) e Rocha & Pires-Zottarelli (2002), entretanto nessa pesquisa existiu diferencial por apresentar crescimento em substrato queratinoso, de ecdise de cobra.

Gonapodya prolifera (Cornu) A. Fisch. Rabenhorst, Kryptogamen

Basiônimo: *Monoblepharis prolifera* Cornu, Ann. Sci. Nat., Bot. 15: 16. 1877.

Descrição: Taylor & Francis (1993)

Material examinado: Amostras de água, isca de semente.

Possui registro de ocorrência no Amazonas, Piauí, Minas Gerais, São Paulo.

Apresentando micélio com hifas regulares, formando pseudo-septos que as divide em segmentos clavados, e zoosporângios abundantes elíptico-alongados e com proliferação interna são características típicas desta espécie que foram visualizadas nos espécimes isolados neste estudo, concordando com a descrição de Karling (1977).

Gonapodya polimorpha Thaxter, Bot. Gaz. 20: 481. 1895

Descrição: Pires-Zottarelli & Gomes (2007).

Material examinado: Amostras de água e solo, isca de exoesqueleto de camarão.

Possui registro de ocorrência no Amazonas, Piauí, São Paulo entre outros.

Suas características principais são talo eucárpico, endobiotico, hifas dicotômicas, irregulares, ramificadas. Zoosporângios terminais, variáveis na forma, ovais, proliferação interna 12-30 µm diâm essas características concordam (Sousa, 2014).

Karlingiomyces granulatus (Karling) Sparrow Jr., Aquatic Phycomycetes, p. 563. 1960.

Basiônimo: *Karlingia granulata* Karling, Mycologia 39: 57.1947.

Descrição: Nascimento & Pires-Zottarelli (2010), como *Karlingia granulata* Karling.

Material examinado: Amostras de água e solo, iscas de celofane camarão e milho.

Possui registro de ocorrência no Amazonas, Rondônia, Minas Gerais, São Paulo.

Zoosporângios exo e/ou endoperculados, parede lisa, mas tornando-se enrugada na maturidade, com coloração de hialina a acinzentada, rizóides extensivos e geralmente constritos, são características marcantes desta espécie. A espécie apresentou crescimento em substratos celulósicos, palha de milho, celofane concordando com Karling (1947), Dogma Jr. (1974a) e Rocha & Pires- Zottarelli (2002).

Karlingia rosea (de Bary & Woronin) Johanson, Am. J Bot. 31: 399. 1944.

Material examinado: Amostra de solo, isca de palha de milho, celofane e epiderme de cebola. Possui registro de ocorrência no Amazonas, Bahia entre outros.

Essa espécie apresenta por características talo eucárpico, monocêntrico, extraintramatrical. Rizóides partindo de vários pontos da superfície do zoosporângio. Zoosporângios endoperculados esféricos, parede espessa e lisa conteúdo róseo-alaranjado. Zoospóros esféricos. (Pires- Zottarelli & Gomes, 2007).

Essa espécie se caracteriza pela presença de um rizomicélio delicado, ramificado, com células turbinadas e septadas, zoosporângios inoperculados, onde são formados zoósporos com uma típica gotícula lipídica dourada, e esporos de resistência com um glóbulo lipídico de coloração dourada, o que foi observado nos espécimes isolados, estando de acordo com a descrição original de Karling (1931). (Karling 1945).

Nowakowskiella elegans (Nowak.) Schroeter, Engler and Prantl, Naturlichen Pflanzenfam. 1: 82. 1892/1893.

Basiônimo: *Cladochytrium elegans* Nowak., *pro parte*, in Cohn, Beitr. Biol. Pflanzen 2: 95. 1876.

Descrição: Nascimento & Pires-Zottarelli (2009).

Material examinado: Amostras de água e solo, iscas de ecdise de cobra, palha de milho, celofane, epiderme de cebola, exoesqueleto de camarão.

Possui registro no Amazonas, Goiás, entre outros.

A espécie se caracteriza pela presença de um rizomicélio extensivo e ramificado, com zoosporângios operculados, apofisados ou não, facilmente verificados nos espécimes examinados, concordando com Sparrow Jr. (1960) e Karling (1977).

Nowakowskiella elongata Karling, Bulletin of the torrey Botanical Club 71:375.1944

Material examinado: Amostra de água, isca de exoesqueleto de camarão. Possui registro no Amazonas, Acre entre outros.

Essa espécie vai apresentar talo eucárpico, policêntrico, extramatrical, Zoosporângio operculados, hialinos, raramente hipofisados, clavados alongados ou cilíndricos, ocasionalmente ovais, piriformes ou irregulares, as vezes com conteúdo separados em segmentos basais estéreis por pseudoseptos ou falsa rede, parede lisa delgada, Zoósporos globosos, emergindo por tubo de liberação com glóbulo lipídico conspícuo (Silva, 2002).

Polychytrium aggregatum Ajello, Mycologia 34: 442. 1942.

Descrição: Pires-Zottarelli & Gomes (2007).

Material examinado: Amostras de água e solo, iscas de exoesqueleto de camarão palha de milho, semente e ecdise de cobra.

Possui registro de ocorrência no Amazonas, Piauí, São Paulo.

Com zoosporângios inoperculados e prolíferos, terminais ou intercalares, formando agregados em um rizomicélio ramificado, parede lisa ou com ornamentações tuberculadas e/ou papiladas, são características da espécie, tendo sido observadas nos isolados deste estudo, concordando com a descrição original de Ajello (1942).

Rhizophydium elyensis Sparrow Jr., Trans. Brit. Mycol. Soc. 40: 525. 1957.

Descrição: Nascimento & Pires-Zottarelli (2009).

Material examinado: Amostras de água e solo, iscas de ecdise de cobra e exoesqueleto de camarão.

Possui registro de ocorrência no Amazonas, Piauí, São Paulo.

Essa espécie apresenta como característica marcante o aspecto angular do zoosporângio na maturidade, resultado da formação de várias papilas, e a presença de rizóides delicados e ramificados, saindo de um eixo principal, as quais foram observadas nos espécimes examinados, concordando com a descrição original de Sparrow Jr. (1957). Foi relatada pela primeira vez no Brasil por Pires-Zottarelli & Milanez (1993).

Rhizophydium sphaerotheca Zopf, Abhandlungen. Naturforsch. Gesell. Halle, 17:92. 1887

Material examinado: Amostra de água e solo, iscas de grãos de pólen.

Possui registro no Amazonas, São Paulo entre outros.

Talo eucárpico, monocêntrico, epi-endobiótico. Zoosporângio hialinos, esféricos, parede lisa fina, com dois poros para liberação dos zoósporos; sistema rizoidal delicado, constituído por um único eixo rizoidal, não prolongado. Zoósporos com uma gotícula lipídica conspícua são características marcantes dessa espécie (Utumi, 2010)

Rhizophydium stipitatum Sparrow Jr., Trans. Brit. Mycol. Soc. 40: 528. 1957.

Descrição: Nascimento & Pires-Zottarelli (2009).

Material examinado: Amostras de água e solo, iscas de grãos de pólen.

Possui registro de ocorrência no Amazonas, Piauí, São Paulo.

A formação de zoosporângios com um longo pedúnculo extramatrical no substrato é característica típica desta espécie, algo que se observou nos espécimes isolados (Silva, 2002).
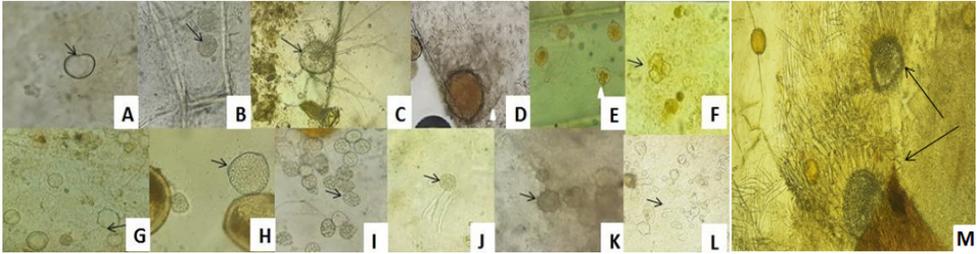
Figura 3.**(A)** *Chytriomyces hyalinus-* Zoosporângio. (B)*Chytriomyces spinosus-*Zoosporângio ornamentado. (C)*Karlingiomyces granulatus-* Zoosporângios com seus rizóides extensivos. **(D)***Karlingia rosea*– Zoosporângio com rizóides partindo de vários pontos. **(E)** *Cladochytrium replicatum-*Zoosporângios com zoósporos**. (F)** *Polychytrium aggregatum*- Zoosporângios agregados.**(G)***Rhizophydium elyensis-*Zoosporângio. **(H)***Rhizophydium sphaerotheca-* Zoosporângio**. (I)***Nowakowskiella elegans-*Zoosporângio**. (J)***Enthophlyctis lobata* **-** Zoosporângio com. rizoides e apresentando vários tubos de descarga. **(K)** *Diplophlyctis sarcoptoides-* Esporo de resistência**. (L)** *Catenophlyctis variabilis-* Zoosporangios. **(N)** *Blastocladia globosa-Z*oosporângio, isca de sorgo. Foto: Eliane

Reino chromista (straminipila *pro part*)

Oomycota

Achlya prolifera Nees, Nova Acta Acad. Leop. Carol., 11: 514. 1823.

Material examinado: Amostra de água e solo, isca de semente de sorgo. Possui registro de ocorrência na Alemanha, Ásia, Brasil, China, Egito, Estados Unidos, entre outros.

As características principais da espécie são os oósporos excêntricos preenchendo todo oogônio e anterídios díclinos envolvendo pedúnculo e oogônio. As características do espécime estão de acordo com a descrição de Johnson (1956), Johnson *et al*. (2002), Pires-Zottarelli (1990, 1999).

Achlya proliferoides Coker, Saprolegniaceae with notes on other water molds, p. 115. 1923.

Descrição: Gomes *et al.* (2003).

Material examinado: Amostra de água iscas de semente. Possui registro de ocorrência no Amazonas, Piauí, Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo, Paraná.

Suas principais características são: oósporos excêntricos, ramos anteridiais díclinos e monóclinos, os quais se enrolam nas hifas, pedúnculos oogôniais e oogônios, o que foi observado nos espécimes isolados nessa pesquisa, e em concordância com Johnson Jr. *et al.* (2002).

Aphanomyces helicoides Von Minden, Kryptogamenfl. Mark Brandenbug 5: 559. 1915

Material examinado: Amostra de solo, isca de semente de sorgo. Possui registro de

ocorrência no Amazonas, São Paulo Piauí entre outros.

Zoosporângios cilíndricos, longos. Zoósporos dispostos em uma única fileira dentro dos zoosporângios. Descarga dos zoósporos aclioides. Oogônios castanhos- amarelados, parede lisa (Utumi, 2010).

Aphanomyces irregulare Scott, Virginia Agricultural Experiment Station, Technical Bulletin. monograph of the genus *Aphanomyces* 151: 47-48. 1961.

Material examinado: Amostras de água e solo, iscas de semente de sorgo, ecdise de cobra e exoesqueleto de camarão. Possui registro no Amazonas, São Paulo, Piauí entre outros.

A espécie possui como característica principal parede interna e externa do oogônio irregular, foi colocada em sinonímia de *A. scaber* de Bary por Howard *et al*. (1970) e Johnson *et al*. (2002), já que esta última pode apresentar variações em suas ornamentações, desde parede irregular à densamente ornamentada.

Dictyuchus sterile

Material examinado: Amostra de água, isca de semente de sorgo.

Zoosporângios cilíndricos a clavados; renovação simpodial ou infreqüentemente basipetalar, desarticulando da hifa. Zoósporos monomórficos, encistando dentro do zoosporângio, e subseqüentemente emergindo individualmente dos cistos reniforme, rede verdadeira, ou falsa; parede do zoosporângio permanecendo intacta ou deliqüescendo. Gemas raras (Johnson *et al*. 2002)

Leptolegniella keratinophila. Huneycutt, J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 68: 110. 1952.

Descrição: Gomes & Pires-Zottarelli (2008).

Material examinado: Amostra de solo do ponto 5 em isca de ecdise de cobra.

Possui registro de ocorrência Amazonas, Piauí, Pernambuco, São Paulo.

Suas principais características são: formação dos esporos de resistência dentro de hifas que apresentam irregularidades formando um micélio extensivo e ramificado, em substrato queratinoso, sem delimitação de zoosporângios, o que foi observado nos espécimes isolados nessa pesquisa, concordando com a descrição original de Huneycutt (1952), Milanez (1970).

Pythiogeton dichotomum Tokun, Trans. Sappooro Nat. Hist. Soc. 14 (1): 12 (1935)

Material examinado: Amostra de solo, isca de semente de sorgo. Possui registro No Amazonas e no Piauí.

Possui como características micélio com hifas finas, moderadamente ramificadas. Zoosporângios terminais nas hifas principais ou em ramos laterais, podendo ou não ser ramificadas dicotomicamente uma ou duas vezes, esféricos 20-30 µm; parede interna delgada. Esses dados concordam com (Negreiros, 2008), (Sousa, 2014).

Pythiogeton ramosum Minden, Falck, Mykol. Unters. Berichte 1: 243. 1916.

Descrição: Gomes & Pires-Zottarelli (2008).

Material examinado: Amostra de água e solo iscas de semente. Possui registro de

ocorrência no Amazonas, Piauí, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo.

Tem por característica principal a presença de zoosporângios terminais, frequentemente irregulares, ou raramente ovais, formando ângulo reto com a hifa de inserção e a ausência de reprodução sexuada, concordando com o descrito por Sparrow Jr. (1960).
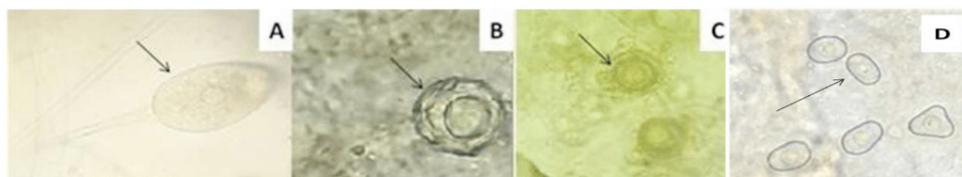
Figura 4. **(A)** *Pythiogeton* sp- Zoosporângio. (**B**) *Aphanomyces irregulare-* Zoosporângio. **(C)** *Aphanomyces* sp- Oogônios com oósporos e anterídios. Zoosporângio. (**D**) *Leptolegniella keratinophila*-Zoosporângio.

Fonte: Ludger.

Em relação aos fungos zoospóricos é comum que esses sejam encontrados não apenas em ambientes aquáticos como também terrestre com grande umidade no caso de algumas espécies, entretanto outras podem ser exclusivas apenas de um dos dois ambientes, optando por viver apenas no solo, ou na água (Willoughby, 1961) (Shearer *et al.* 2007) (Porto, 2015) (Jerônimo, 2015).

Os trabalhos sobre fungos zoospóricos na Amazônia foram iniciados por Karling de (1944 a 1947) que identificou cinquenta e quatro espécies e destas, vinte e cinco foram no Amazonas, algumas das espécies isoladas por ele também foram encontradas nesta pesquisa.

Organismos	**Pontos de Coleta**																
CHYTRIDIOMYCOTA	**1**		**2**		**3**		**4**		**5**		**6**		**7**		**8**		**TOTAL**
	A	**S**	**A**	**S**	**A**	**S**	**A**	**S**	**A**	**S**	**A**	**S**	**A**	**S**	**A**	**S**	
Catenochytridium kevorkiani																**X**	**1**
Catenochytridium sp.							**X**			**X**	**X**						**3**
Chytriomyces hialinus	**X**		**X**	**X**					**X**	**X**					**X**	**X**	**7**
Chytriomyces spinosus		**X**			**X**	**X**		**X**		**X**		**X**		**X**			**7**
Chytriomyces sp.						**X**											**1**
Cladochytrium hialinus				**X**													**1**
Cladochytrium replicatum	**X**	**X**					**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**		**11**
Diplophlyctis sarcoptoides	**X**	**X**					**X**			**X**	**X**	**X**		**X**	**X**	**X**	**9**
Enthophlyctis lobata								**X**									**1**
Gonapodya prolifera	**X**		**X**		**X**			**X**	**X**	**X**	**X**		**X**				**8**

Gonapodya polimorpha										X		X	X				3
Karlingia chitinophyla										X							1
Karlingia rósea										X				X		X	3
Karlingia sp															X		1
Karlingiomyces granulata		X		X	X	X				X		X				X	7
Nowakowskiella elegans	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X			13
Nowakowskiella elongata	X									X							2
Nowakowskiella sp.														X	X	X	3
Podochytrium sp.	X				X		X		X		X		X			X	7
Polychytrium aggregatum		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X			12
Rhizophydium elyensis		X			X	X	X				X						5
Rhizophydium sphaerotheca	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16
Rhizophydium stipitatum					X	X					X	X		X		X	6
Rhizophydium sp.		X				X											2
BLASTOCLADIOMYCOTA																	
Blastocladia globosa			X						X	X			X				4
Bastocladia sp					X		X										2
Catenophlyctis variabilis		X	X		X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	12
OOMYCOTA																	
Achlya prolifera	X	X			X												3
Achlya proliferoides	X				X												2
Achya sp.		X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X		X	12
Aphanomyces helicoides				X													1
Aphanomyces irregulare	X					X			X	X					X		6
Aphanomyces sp.	X	X			X		X	X	X	X		X		X			9
Brevilegnia sp.			X														1
Dictiuchus pseudoachlyoides											X						1
Dictiuchus sterile	X																1
Dictiuchus sp		X	X	X						X		X					5
Leptolegniella keratinophyla										X							1
Pythiogeton dichotomum				X		X											2
Pythiogeton ramosum					X				X	X		X		X			5
Pythiogeton sp 1		X				X			X	X						X	5
Pythiogeton sp 2			X			X						X					3
Saprolegniaceae	X		X	X													3
ZYGOMYCOTA																	
Zoophagus insidians		X														X	2

A= Água S= Solo   X= Presença do fungo no ponto

Tabela 1. Ocorrência dos organismos pertencentes aos filos Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Oomycota e Zygomycota coletados em água e solo de igarapés de áreas preservadas da Reserva Particular do patrimônio Nacional ‘Sítio Bons Amigos’, em setembro de 2019 e março de 2020-AM.

São alguns dos representantes do Reino Fungi, Filo Chytridiomycota: *Cladochytrium replicatum, Chytriomyces hialinus, Rhizophidium sphaerotheca*. (Tabela 1). Já Silva (2002) em sua Tese de Doutorado identificou vinte e quatro táxons distribuídos em quinze gêneros pertencentes ao Filo Chytridiomycota, sendo as espécies mais frequentes: *Catenophlyctis variabilis, Chytriomyces spinosus, Diplophlyctis sarcoptoides, Karlingia rosea, Karlingiomyces granulata, Rhizophidium elyenses, Rhizophidium sphaerotheca, Nowakskiella elongata e Polychytrium aggregatum,* que também se mostraram frequentes nessa pesquisa. Entretanto *Rhizophidium sphaerotheca* foi mais frequente nessa pesquisa que *Catenophlyctis variabilis.* As características das espécies encontradas neste trabalho são semelhantes com a descrição apresentada por Pires-Zottarelli & Milanez, (1993), Sparrow, (1960), Karling, (1977) e Ferreira (2014) assim também como os trabalhos mais recentes de Barthelemy e Silva, (2020). É relevante ressaltar ainda a ocorrência de um outro representante do Filo Blastocladiomycota, a *Blastocladia globosa,* que foi identificada pela primeira vez no Amazonas, sendo essa já descrita em São Paulo e outros estados do Brasil.

No Filo Oomycota foram observadas ocorrência exclusiva de solo para os seguintes representantes: *Aphanomyces helicoides, Leptolegniella keratinophyla* e *Pythiogeton dichotomum,* já para exclusivos de água foram: *Achya prolifera, Achlya proliferoides* e *Dictiuchus sterile*. Os demais tiveram ocorrências na água e também no solo (Tabela 1). Dentro do Filo Oomycota Silva (2002) identificou vinte e um táxons distribuídos por oito gêneros. Onde *Aphanomyces helicoides* foi à espécie mais frequente tanto para água quanto para solo. Já nesse trabalho os resultados foram diferentes.

Das iscas utilizadas o maior registro foi em palha de milho. A maior frequência, tanto para água quanto para solo foi de representantes pertencentes ao filo Chytridiomycota (Tabela 1).

Durante a coleta foi mensurado temperatura e pH de água e solo, porém os valores demonstraram pouca variação entre os pontos.

Os resultados obtidos possibilitam a ampliação do conhecimento de fungos zoospóricos existentes em algumas áreas preservadas ao longo da região amazônica.

5 I CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitam a ampliação de dados em relação à diversidade de organismos zoospóricos no Amazonas.

Existe uma real necessidade de mais estudos sobre fungos zoospóricos em áreas preservadas, ampliando desse modo o conhecimento desse ecossistema.

É importante ressaltar que uma primeira citação para espécie *Blastocladia globosa* no Amazonas, foi obtida nessa pesquisa.

Entre os representantes do Filo Chytridiomycota, a espécies mais frequente foi

Rhyzophydium sphaerotheca, observada em todas as placas de água e solo da primeira coleta.

No Filo Oomycota, a espécie com maior ocorrência foi *Aphanomyces irregulare.*

REFERÊNCIAS

AJELLO, L. (1942). *Polychytrium*, a new cladochytriaceous genus. **Mycologia** 34: 442-451.

AJELLO, L. (1948). A cytological and nutrition study of *Polychytrium aggregatum*, I: Citology. **American Journal of Botany** 35: 1-12.

ALEXOPOULOS, C. J.; Mims, C. W.; Blackwell, M. (1996*)* **Introductory Mycology***.* 4th.Ed. New York: John Willey, Sons, Inc. 869p.

BARTHELEMY, J. L & SILVA, M.I.L (2020). Estudo sobre a diversidade de fungos zoospóricos que ocorrem no lago do Puraquequara, Manaus, Amazonas.(Capítulo 10). **Micologia:Fungos e/ou seus Metabólitos como objeto de Estudo.** Brasil. Ed. Atena:74-96:163. (recurso eletrônico)

BENEKE, E.S. & Rogers, A.L. **(**1962). Aquatic Phycomycetes isolated in the states of Minas Gerais, São Paulo, and Paraná, Brazil. **Rickia** 1: 181-193p.

BERDAN, H. B.(1941). A development study of three saprophytic chytrids. I. Cladochytrium hyalinum sp. nov. **Amer. J. Bot.** 28: 422—438, fig. 1—84. — 1942.

CAVALCANTI, M. S. (2000) **Fungos isolados as água e do solo das margens dos açudes da Prata e do Meio, na Reserva Florestal de Dois Irmãos, Recife-PE**. São Paulo (SP). Tese (Doutorado). Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo, São Paulo 316p.

COSTA, M. F.**,** ROCHA, J. de R. de S. (2010) **Diversidade e potencial patogênico de fungos zoospóricos (Chytridiomycota e Oomycota) no criatório de peixes, no povoado Pinto, município de Timon,** Maranhão. 1-5 p.

DOGMA J, I.J. (1974). Studies on chitinophilic *Siphonaria, Asterophlyctis* and *Rhizoclosmatium,* Chytridiales, II: *Asterophlyctis sarcoptoides* H.E. Petersen: a *Diplophlyctis* with a sexual phase. **Nova Hedwigia** 25: 1-50p.

DUDKA,I.O.; Koval, E. Z. (1994) Micromycetes of Kremenchuch reservoir*. **Ukrayins'kyi Botanichnyi Zhurnal,*** v.51, n. 4, 53 – 57p.

FAY, D.J. (1947). *Chytriomyces spinosus* nov. sp. **Mycologia** 39: 152-157.

FERREIRA, S. A. J.(2013) **Fungos zoospóricos identificados a partir de coletas em lagos existentes na ilha de Parintins, Amazonas,** Monografia-Universidade Federal do Amazonas 1-34p.

FERREIRA, A D. S. (2014) **Avaliação da diversidade de fungos zoosporicos coletados em ambientes de várzea em Iranduba, Amazonas,** 33-39p.

HIROHARU. I. (1940) Studies on japonese aquatic fungi, II. The Blastocladiaceae. **Science reports of The Tokyo Dunrika Daigaku**, p.237-284

JERÔNIMO, G. H., Jesus, A.L., Manano, A.V., James, T.Y., Souza, J.I., Rocha, S.C.O., Pires-Zottarelli, C.L.A. (2015). **Diversidade de Blastocladiomycota, Chytridiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia,** SP, Brasil. p. 135-163.

JOHNSON, J. S, (1956) ***The*** **Genus** ***Achlya:*** **morfology** ***and taxonomy***. Ann. Arbor: University of Michigan Press. 180p.

JOHNSON, J.S., Seymour, R.L. & Padgett, D.E. **(**2002). **Biology and systematics of Saprolegniaceae.** Disponível em > www.uncw.edu/people/padgett/book. Acesso em Novembro/2002.

KARLING, J.S. (1931). Studies in Chytridiales, VI: **The** occurrence and life history of a new Species of *Cladochytrium* in cells of *Eriocaulon septangulare.* **American Jornal of Botany** 18:526-557.

KARLING, J, S. (1945ª) Brazilian chytrids, VI: *Rhopalophlyctis* and C*hytromyces,* two new operculate genera. **American Journal of Botany** 32:362-369.

KARLING, J, S.(1947). Keratinophilic chytrids, II: *Phlyctorhiza variabilis* n sp. **American Jornal of Botany 34:27-32**

KARLING, J.S. (1947). Brazilian chytrids, X: New species with sunken opercula. **Mycologia** 39:56-70.

KARLING, J. S. (1977) ***Chytridiomycetarum Iconographia***. J. Cramer. 414p.

KIRK, P. M.; Cannon P. F., Minter D. W. & Stalpers J. A. (2008). **Dictionary of the fungi**. 10 ed., CABI Bioscience, Wallingford.771p.

MILANEZ, A.I. & Trufem, S.F.B. (1981). Ficomicetos em frutos submersos, do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, Sao Paulo. **Rickia** 9: 7-15.

MILANEZ, A.I.; Pires-Zottarelli, C.L.A. & Gomes, A.L. (2007)**. Brazilian zoosporic fungi.** Conselho Nacional de Pesquisa, São Paulo. 112p.

MOORE-LANDECKER, E. (1996). **Fundamentals of fungi.** 4nd ed. New Jerseyv: Prentice Hall,

MOREIRA, C. G.; Schoenlein-Crusius, I. H. (2010) **Fungos em ambientes aquáticos continentais.** Tese (Doutorado) Instituto de Botânica - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente; 1- 20p.

NASCIMENTO, C.A. & Pires-Zottarelli, C.L.A. (2009). Chytridiales (Chytridiomycota) do Parque Estadual da Serra da Cantareira. **Acta Botanica Brasilica** 23: 459-473.

NASCIMENTO, C.A. & Pires-Zottarelli, C.L.A. (2010). **Blastocladiales** e Spizellomycetales do Parque Estadual da Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 33: 693-704.

NASCIMENTO, C A.; PIRES-ZOTTARELI. C.L.A. (2012) **Diversidade de Fungos Zoosporicos da Reserva Biológica de Mogi Guaçu, estado de São Paulo**, Brasil.

PAIVA, I. A. F. (2013**) Diversidade de Fungos Zoospóricos Identificados a partir de coletas em bancos de macrófitas desenvolvidas em lagos existentes na ilha de Paritins, Amazonas**, 1- 28p.

PEREIRA, A. A.; Rocha, J. R. S.(2008**)** ***Pythium*** (Pythiaceae): três novos registros para o Brasil. ***Acta Botânica Malacitana*,** 1 – 4, 33p.

PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.(1990) **Levantamento dos fungos zoospóricos (Mastigomycotina), da Represa do Lobo ("Broa"), São Carlos** – SP. Dissertação de Mestrado. 176p.

PORTO, M. B. B. (2015). **Diversidade de organismos zoospóricos em um fragmento florestal urbano de Manaus, AM, Brasil**. Monografia de conclusão de curso. 50p.

ROCHA, J. R. S.; Milanez, A. I.; Pires-Zottarelli, C. L. A. (2001) **O gênero *Pythium* (Oomycota) em área de cerrado no Parque Nacional de Sete Cidades**, Piauí, Brasil. **Hoehnea***,* São Paulo, v. 28, n. 3, 209-230p.

SHEARER, C.A.; Descals, E.; Kohlmeyer, B.; Kohlmeyer, J.; Marvanová, L.; Padgett, D.; Porter, D.; Raja, H.A.; Schmit, J.P.; Thorton, H.A. & Voglymayr, H. (2007)**. Fungal biodiversity in aquatic habitats. Biodiversity Conservation** 16:49-67.

SILVA NETO, B R. (2020). (Organizador). **Micologia** (recurso eletrônico)**: fungos e/ou seus metabólitos como objeto de estudo.** Editora Atena. 174p.

SILVA, M. I. L.(2002) **Micobiota de água e de solo das margens de igarapés na área de mata do Campus da Universidade do Amazonas***.* São Paulo, Tese (Doutorado) – Instituição de Biociências - Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, 175p.

SOUSA, N. D. C. (2014) **A percepção da poluição e o impacto sobre os organismos zoospóricos no rio Poti, Teresina-Pi.** Tese de (Mestrado)- Universidade Federal do Piauí, 68-135p.

SPARROW J, F. K.(1960) ***Aquatic Phycomycetes.*** *2 ed.* University of Michigan Press, Ann Arbor.

SPARROW J., F.K.(1957). A further contribution to the Phycomycete flora of Great Britain. **Transactions of British Mycological Society** 40: 523-535.

STEMPNIEWSKI. H.L (1970). Doenças parasitarias de peixes-generalidades.(em Poluição e piscicultura) Com interestad Bacia Paraná- Uruguai**. Fac Saúde Pub**. USP.p 155-162

UTUMI, E. Y. K. (2010). **Identificação de fungos zoospóricos em igarapés localizados no Campus da UFAM.** Monografia de conclusão de curso. 42p.

WILLOUGHBY, L.G. (1961)**.** The ecology of some lower fungi at Esthwaite water. **Transactions of the British Mycological Society** 44: 305-332.

CAPÍTULO 11

EFEITO ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS CONTRA *Colletotrichum sp*

Data de aceite: 19/01/2021
Data de submissão: 02/01/2021

Felipe Guilherme Brunetto Bretschneider
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Departamento de Engenharia de Alimentos
Francisco Beltrão - Paraná
http://lattes.cnpq.br/4399957193363483

Bruna Regina Pereira Rocha
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos
Francisco Beltrão – Paraná
http://lattes.cnpq.br/4701952276005121

Cleusa Ines Weber
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos
Francisco Beltrão - Paraná
http://lattes.cnpq.br/7416801410466235

Alessandra Machado-Lunkes
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos
Francisco Beltrão - Paraná
http://lattes.cnpq.br/9970617360931344

Cláudio Roberto Novello
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Departamento de Química e Biologia
Francisco Beltrão - Paraná
http://lattes.cnpq.br/1320898705112948

RESUMO: Atividade antifúngica dos extratos vegetais de babosa (*Aloe vera)*, capim limão (*Cymbopogon citratus)* e gengibre (*Zingiber officinalle)* contra o *Colletotrichum* sp. foi realizada usando a técnica de microdiluição. A concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) para uma solução hidroalcoólica contendo 10% do vegetal foi determinada usando a concentração de 10^5 esporos.mL^{-1} de *Colletotrichum* sp.. Os resultados obtidos foram: babosa (CIM = 16 mg.mL^{-1} e CFM > 16 mg.mL^{-1}), capim limão (CIM = 16 mg.mL^{-1} e CFM > 16 mg.mL^{-1}) e gengibre (CIM = 8 mg.mL^{-1} e CFM = 8 mg.mL^{-1}). O solvente utilizado na diluição dos extratos (50% DMSO e 50% etanol 70%) não apresentou atividade. Todos os extratos vegetais foram capazes de inibir a proliferação do fungo e apenas o extrato de gengibre apresentou ação fungicida nas concentrações testadas.

PALAVRAS-CHAVE: Extratos vegetais. Atividade antifúngica. Concentração inibitória mínima. Concentração fungicida mínima.

ANTIFUNGAL EFFECT OF HYDROALCOHOLICS EXTRACTS AGAINST *Colletotrichum sp*

ABSTRACT: Antifungal activity of plant extracts of “babosa” (*Aloe vera*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and ginger (*Zingiber officinalle*) against *Colletotrichum* sp. was performed using a microdilution technique. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicide Concentration (MFC) were determined for a hydroalcoholic solution containing 10% of the vegetable supplied using a concentration of 10^5 spores.mL^{-1} of *Colletotrichum* sp.. The results

were: “babosa” (MIC = 16 mg. mL^{-1} and MFC > 16 $mg.mL^{-1}$), lemongrass (MIC = 16 $mg.mL^{-1}$ and MFC > 16 $mg.mL^{-1}$) and ginger (MIC = 8 $mg.mL^{-1}$ and MFC = 8 $mg.mL^{-1}$). The solvent used in the dilution of the extracts (50% DMSO and 50% 70% ethanol) has no active. All plant extracts were to inhibit the proliferation of the fungus and only the ginger extract showed fungicidal action in the tested concentrations.
KEYWORDS: Plants extracts. Antifungal activity. Minimum inhibitory concentration. Minimum fungicidal concentration.

1 I INTRODUÇÃO

O morango é um pseudofruto altamente perecível, de curta vida de prateleira e que possui preço elevado (CALEGARO; PEZZI; BENDER, 2002). Pertencente ao grupo de frutos não climatéricos, no qual não ocorre amadurecimento após a colheita, não possui camada superficial protetora contra a perda de água, desidrata facilmente e perde massa fresca (CHITARRA; CHITARRA, 2005; CANTILLANO, 2006).

A deterioração fúngica é um dos principais problemas que afetam a qualidade do morango (CALEGARO; PEZZI; BENDER, 2002). Neste caso, os fungos dos gêneros *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Phomopsis* e *Rhizopus* são os principais responsáveis pela deterioração microbiológica de morangos. O *Colletotrichum* é o causador da antracnose, doença que causa podridão seca e de coloração escura, sendo uma das doenças mais relevantes do morangueiro (REIS; COSTA, 2011).

Dentre os potenciais antimicrobianos naturais que atualmente estão sendo pesquisados, destaca-se a babosa (*Aloe vera)*, capim limão (*Cymbopogon citratus)* e gengibre (*Zingiber officinalle).*

A *Aloe vera,* além de suas aplicações farmacêuticas e funcionais, apresenta empregos como aditivo em alimentos. Possui perspectiva promissora na utilização como inibidor da proliferação microbiana de alimentos de origem vegetal, estendendo a vida útil do alimento e enriquecendo sua qualidade nutricional (SILVA, 2010).

As plantas do gênero *Zingiber* possuem diversas propriedades medicinais e grandes aplicações na culinária, além de apresentarem atividade antioxidante elevada (DABAGUE *et al*., 2011). Outro aspecto de interesse é sua capacidade antifúngica, estudos apresentaram considerável redução de micélios de *Botrytis cinerea* em morangos, indicando efeito fungitóxico (ZANCAN *et al*., 2002; ANDREO; JORGE, 2007).

O *Cymbopogon citratus* possui origem oriental e *é largamente empregado em produtos fármacos e na produção de aromatizantes. Sua at*ividade antifúngica está ligada com a presença do citral em seu extrato, composto eficaz na inibição de 22 espécies microbianas. Contra o *Botrytis cinerea,* foi relatada inibição de 100% de seus esporos através de componentes voláteis do extrato de capim limão (ALMEIDA *et al*., 2013; DUARTE; ZANETI, 2004; LORENZZETI *et al*., 2011).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a concentração inibitória

e fungicida mínima dos extratos hidroalcoólicos de *Aloe vera*, *Cymbopogon citratus* e *Zingiber officinalle* contra o fungo *Colletotrichum* sp..

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

O carvacrol (Sigma-Aldrich, USA) foi diluído em etanol 70% e sua concentração variou de 0,68 - 300 mM. O *Colletotrichum* sp. CCT 7530 utilizou o meio de cultivo Extrato de Malte, sua manutenção foi executada regularmente com armazenamento a 4 ºC na ausência de luz. As análises microbiológicas realizadas utilizaram a concentração de 1×10^5 esporos.mL^{-1}, padronizadas com o auxílio da câmara de Neubauer.

Os controles utilizados para a análise foram o carvacrol, devido a sua atividade antifúngica comprovada na literatura para este microrganismo, e a solução de 50% de DMSO e 50% de etanol 70%, para avaliar a atividade antifúngica do solvente dos extratos vegetais.

2.2 Obtenção dos extratos vegetais

Para obtenção dos extratos de *Aloe vera*, *Cymbopogon citratus* e *Zingiber officinalle* foi utilizada uma solução hidroalcoólica 80% (p/p, álcool etílico/água) contendo 10% (p/p) do vegetal em relação ao líquido extrator. As plantas foram cortadas em pequenas frações e secas durante 8 dias em temperatura ambiente. Após a secagem, foram adicionadas à solução hidroalcoólica 80% e submetidas a três turbo extrações de 5 minutos, com intervalos de repouso de 5 minutos cada. Cada extrato foi submetido à filtração a vácuo e acondicionado sob-refrigeração a 8 °C. O solvente dos extratos foi removido em evaporador rotativo e posteriormente liofilizado.

Para obtenção das concentrações de 160 mg.mL^{-1} a 0,31 mg.mL^{-1} dos extratos vegetais, foi utilizada uma solução de 50% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 50% de etanol 70%.

2.3 Atividade antifúngica

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do carvacrol foi realizada em microplaca de ELISA, a borracha seladora de silicone (Axygen) foi utilizada devido à volatilização do carvacrol. O protocolo seguiu o método descrito por Fieira *et al*. (2013). A CIM representa a menor concentração que o carvacrol foi capaz de inibir a proliferação do microrganismo.

Para determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), foi retirado o conteúdo total do poço que não apresentou proliferação fúngica, inoculando-o em meio de cultivo sólido. As placas foram incubadas nas condições ideais de proliferação do microrganismo, 28 ºC durante 7 dias. Após a incubação foi realizada a contagem de

colônias totais características do bolor (ESPINEL-INGROFF, 2001). A CFM foi determinada como a mínima concentração em que o carvacrol foi capaz de inibir o crescimento do fungo.

3 I RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados das análises antifúngicas *in vitro* para os três extratos vegetais utilizados contra o *Colletotrichum* sp. são apresentados na Tabela 1. Todos os extratos foram capazes de inibir a proliferação do fungo teste, entretanto, em quantidade superior ao controle positivo (carvacrol).

O processo de obtenção dos extratos a partir do tecido vegetal extrai, além das moléculas responsáveis pela atividade antifúngica, outras substâncias de afinidade com o líquido extrator. Isto ocasiona na redução da concentração das moléculas de interesse antimicrobiano e, consequentemente, na diminuição desta atividade (LOPES *et al*., 2008). Como encontrado por Uda *et al*. (2008) onde o controle utilizado (Mancozed, composto puro) apresentou atividade antifúngica de até 76 vezes maior que o extrato de *Aloe vera*.

	Babosa	**Gengibre**	**Capim Limão**	**Carvacrol**	**50% DMSO + 50% etanol 70%**
CIM (mg.mL^{-1})	16	8	16	0,282	ND
CFM (mg.mL^{-1})	> 16	8	> 16	0,282	ND

ND: Não detectada.

Tabela 1 – CIM e CFM dos extratos vegetais e controles (carvacrol e solução de 50% DMSO e 50% etanol 70%).

O extrato de babosa apresentou CIM semelhante a da inibição contra *Aspergillus flavus* e *niger* (CIM = 9 mg.mL^{-1}). Em outro estudo o *Colletotrichum capsici* teve inibição micelial de 1,31 - 7,2% utilizando o extrato de *Aloe vera* de 1-5 mg.mL^{-1} (UDA *et al.,* 2018; PAGI; PATEL, 2017).

O gengibre foi o único extrato a apresentar CFM, analisando a literatura, o extrato de Zingiber *officinalle é relatado por* Taechowisan e Lumyong (2003) como inibidor do *Colletotrichum musae* e *Fusarium oxysporum* na concentração de 10 mg.mL^{-1}.

Para o extrato de capim limão, resultado semelhante foi encontrado para o *Colletotrichum gloeosporioides* onde ocorreu a inibição micelial de 97,7% de deste microrganismo em uma concentração de 10 mg.mL^{-1} do extrato. (CORDERO *et al*., 2017).

Conforme o apresentado é possível identificar a atividade antimicrobiana dos estratos vegetais de babosa, capim limão e gengibre contra diversos gêneros fúngicos em

concentração semelhante ao obtido deste trabalho.

4 | CONCLUSÃO

Diante dos resultados antifúngicos para os extratos hidroalcoólicos de babosa, capim limão e gengibre, foi possível identificar que todos os extratos vegetais apresentaram concentração inibitória mínima. Contudo, apenas o extrato de gengibre apresentou ação fungicida nas concentrações testadas. O solvente utilizado na diluição dos extratos não contribuiu para a inibição do fungo teste, atribuindo à atividade antifúngica apenas aos extratos vegetais.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. B. A. *et al*. **Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp.**. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 15, n. 4, p. 474-482, 2013.

ANDREO, D.; JORGE, N. **Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de gengibre (*Gengiber officinale*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 66, n. 2, 2007.

CALEGARO, J. M.; PEZZI, E.; BENDER, R. J. **Utilização de atmosfera modificada na conservação de morangos em pós-colheita**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 37, n. 8, p. 1049-1055, 2002.

CANTILLANO, R. F. F. **Fisiologia e manejo na colheita e pós-colheita de morangos.** In: CARVALHO, S.P. Boletim do morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico. Belo Horizonte: FAEMG, 2006, p. 97-105.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio.** Lavras: FAEPE, 2° Edição, 2005.

CORDERO, A. P. *et al*. **Atividade antifúngica de *Cymbopogon citratus* contra *Colletotrichum gloeosporioides***. Agronomía Mesoamericana, v. 28, n. 2, p. 465-475, 2017.

DABAGUE, I. C. M. *et al*. **Teor e composição de óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) após diferentes períodos de secagem**. Revista Brasileira Plantas Medicinais, v. 13, n. 1, p. 79-84, 2011.

DUARTE, M. R.; ZANETI, C. C**. Estudo farmacobotânico de folhas de capim-limão: *Cympobogon citratus* (DC.). STAPF, POACEAE**. Visão Acadêmica, v. 5, n. 2, p. 117-124, 2004

FIEIRA, C. *et al*. ***In vitro* and *in vivo* antifungal activity of natural inhibitors against *Penicillium expansum*.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 33, n. 1, p. 40-46, 2013.

LOPES, E. A. *et al*. **Controle de *Meloidogyne javanica* com diferentes quantidades de torta de nim (*Azadirachta indica*)**. Revista Trópica, v.2, n.1, p.17, 2008.

LORENZZETI, E. R. *et al*. **Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro.** Revista Brasileira Plantas Medicinais, v. 13, p. 619-627, 2011.

PAGI, D. D. N.; PATEL, H. J. P. **Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Aloe vera (Aloe barbadensis Miller*)**. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, v. 6, n. 3, p. 2152-2162, 2017.

REIS, A.; COSTA, H. **Principais doenças do morangueiro no Brasil e seu controle**. 96. ed. Brasília: Embrapa, 2011.

SILVA, E. R. D. **Avaliação do potencial de revestimentos de quitosano e *Aloe vera* em morangos.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade de Aveiro, 2010.

TAECHOWISAN, T.; LUMYONG, S. **Activity of endophytic actinomycetes from roots of *Zingiber officinale* and *Alpinia galanga* against phytopathogenic fungi**. Annals of Microbiology, v. 53, n. 3, p.291-298, 2003.

UDA, M. N. A. *et al*. **Assessing antimicrobial activity of *Aloe Vera* against *Colletrotrichum capsici* and *Bacillus subtilis***. Bioprocess and Biosystem, v. 10, n. 1, p.51-62, 2018.

ZANCAN, K. C. *et al*. **Extraction of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) oleoresin with CO_2 and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts.** The Journals of Supercritical Fluids, v.24, p.57-76, 2002.

CAPÍTULO 12

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA ESPOROTRICOSE

Data de aceite: 19/01/2021
Data de submissão: 16/11/2020

Luana Rossato
Faculdade de Ciências da Saúde
Dourados-Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/6429982229782529

RESUMO: A esporotricose caracteriza-se como uma micose subcutânea causada por fungos dimórficos do gênero *Sporothrix,* capazes de acometer o homem e uma grande variedade de animais, dentre eles os felinos. A princípio, *Sporothrix schenckii* era a única espécie conhecida como responsável pela esporotricose. Após estudos genotípicos e fenotípicos de isolados clínicos humanos e animais, verificou-se alta variabilidade entre os isolados e estabeleceu-se a existência de um Complexo *Sporothrix*. Dentro deste, a maior causadora de surtos epidêmicos, justificada por uma maior virulência e capacidade de evasão da resposta imune, é a espécie *Sporothrix brasiliensis*. Nesse sentido destaca-se a importância de receptores Toll like-2 (TLR-2) e Toll like-4 (TLR-4) na infecção por S. brasiliensis. A investigação da resposta imune in vitro mostra a dependência dos receptores TLR-2 e TLR-4 no desencadeamento da resposta imune. Os ensaios in vivo mostram importância desses receptores no controle da infecção e dependência dos mesmos na produção de citocinas, principalmente nos primeiros 14 dias de infecção. Estudos que investiguem a utilização de outras vias de sinalização como mecanismos compensatórios, bem como, o sinergismo desses receptores no contexto da infecção por S. brasiliensis são fundamentais na compreensão da fisiopatologia dessa doença.

PALAVRAS-CHAVE: *Sporothrix brasiliensis*, imunologia, microbiologia.

IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF SPOROTHRICOSIS

ABSTRACT: Sporotrichosis is characterized as a subcutaneous mycosis caused by dimorphic fungi of the genus *Sporothrix,* capable of affecting humans and a wide variety of animals, including felines. At first, *Sporothrix schenckii* was the only species known to be responsible for sporotrichosis. After genotypic and phenotypic studies of human and animal clinical isolates, there was high variability between the isolates, and the existence of a *Sporothrix* Complex was established. Within this, the main cause of epidemic outbreaks, justified by a greater virulence and ability to evade the immune response, is the species *Sporothrix brasiliensis*. In this sense, the importance of Toll like-2 (TLR-2) and Toll like-4 (TLR-4) receptors in *S. brasiliensis* infection is highlighted. The investigation of the immune response in vitro shows the dependence of TLR-2 and TLR-4 receptors in triggering the immune response. In vivo tests show the importance of these receptors in the control of infection and their dependence on the production of cytokines, especially in the first 14 days of infection. Studies that investigate the use of other signaling pathways as compensatory mechanisms, as well as the synergism of these

receptors in the context of infection by *S. brasiliensis* are fundamental in understanding the pathophysiology of this disease
KEYWORDS: *Sporothrix brasiliensis*, immunology, microbiology.

1 | INTRODUÇÃO

A esporotricose foi primeiramente descrita por Benjamin Schenck, em 1898, nos Estados Unidos (EUA), por meio do isolamento do agente etiológico de lesões da mão direita de um paciente de 36 anos. Alguns anos atrás, o gênero *Sporothrix* era tratado como uma única espécie patogênica, *S. schenckii*, (LACAZ, 1998). No entanto, hoje devemos considerar a antiga espécie, até então conhecida como *Sporothrix schenckii*, como um complexo de seis espécies crípticas, isto é, seis espécies com características morfológicas parecidas, mas distintas ao ponto de vista genotípico (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

Além de identificar novas espécies, tais estudos também permitiram agrupá-las segundo sua distribuição geográfica (MARIMON et al., 2006). O grupo 1 refere-se à *Sporothrix brasiliensis*, principal causador da epidemia zoonótica no Rio de Janeiro, Brasil; o grupo 2 inclui *S. schenckii* stricto sensu, isolado principalmente nos Estados Unidos e na América do Sul; o grupo 3 contem *S. globosa*, de distribuição mundial; o grupo 4, com *S. mexicana*, é restrito ao México; e o grupo 5 é constituído por *S. albicans*, relacionado à Europa, e *S. luriei*, considerada rara, com poucos relatos de infecção em humanos (MARIMON et al., 2006). Análises filogenéticas de DNAr e β-tubulina sugerem que *S. albicans, S. pallida* e *S. nivea*, dada a similaridade, deveriam ser considerados uma espécie única, *S. pallida* (MEYER et al., 2008). Tornou-se evidente que as novas espécies do complexo *Sporothrix* descritas– *S. albicans, S. luriei, S. brasiliensis, S. globosa, S. mexicana* e *S. schenckii stricto sensu* - possuem características fenotípicas e genotípicas distintas e são de interesse clínico (MARIMON et al., 2006; MARIMON et al., 2007).

A esporotricose geralmente é uma doença adquirida pela implantação traumática do fungo no tecido subcutâneo pelo contato com um material contaminado, como espinhos, farpas de madeiras e outros materiais de origem vegetal. Porém outras formas incomuns de inoculação também já foram descritas, como picada de inseto e outras formas de transmissão por animais como roedores, cães, tatus, cavalos e aves (KWON-CHUNG & BENNET, 1992).

No entanto, o panorama da esporotricose no Brasil mudou ao longo dos anos e diversos pesquisadores fizeram referência ao papel dos gatos na transmissão da esporotricose para humanos e a associação dessa epidemia a espécie *S. brasiliensis* (MIRANDA et al., 2016). Essa forma de transmissão conta com um agravante: o comportamento felino. Animais adultos saem durante a noite em busca de caça ou em função dos rituais reprodutivos, quando a fêmea em cio, costuma atrair os machos que irão disputá-la em brigas. Nestas ocasiões, animais portadores de lesões ulceradas,

com grande quantidade de células leveduriformes, poderão transmitir a esporotricose pelo contato direto com essas lesões ou pelos ferimentos produzidos por mordeduras ou arranhaduras de gatos doentes (MONTENEGRO et al., 2014). Outro comportamento felino que facilita a disseminação da esporotricose é que diferentemente dos cães, que se fixam nos locais onde vivem, o gato sai de casa, caminhando pela rua, caçando pássaros, ratos e outros pequenos animais, se relaciona com outros gatos e eventualmente, volta para casa. Somado ao fato de que em algumas regiões a população de gatos nas ruas e praças tem aumentado consideravelmente, e algumas pessoas têm o hábito de recolherem animais (sadios ou doentes) das ruas, abrigando-os em casas ou apartamentos, formando colônias numerosas, sem qualquer controle sanitário. Quando o proprietário toma conhecimento dos riscos de contágio para ele e seus familiares, abandona esses animais, ou até mesmo quando esses animais morrem, são enterrados em locais inapropriados, contribuindo para a disseminação dessa doença (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011). Estudos mostraram que 70% dos pacientes com suspeita de esporotricose que procuram a Fiocruz para um primeiro atendimento, já haviam dado um destino inadequado ao seu animal, perpetuando o ciclo de transmissão da doença (GALHARDO, 2011).

No que diz respeito aos casos de esporotricose tanto em humanos quanto animais, os dados são alarmantes. Entre 1998-2004, 1503 casos de esporotricose felina foram notificados em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro e, no período de 1998-2009, foram reportados cerca de 2.200 casos humanos na mesma região (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011). Já no período de 2005 a 2011, 2301 casos de esporotricose felina por *S. brasiliensis* foram diagnosticados no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (Lapclin-Dermzoo)/Instituto Nacional de Infectologia/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (PEREIRA et al., 2014). Dados da Vigilância Sanitária do Rio de Janeiro mostram um aumento de 400% no número de felinos diagnosticados com esporotricose em 2016, quando comparados a 2015, revelando a magnitude e a expansão dessa doença. No ano de 2016 foram feitos 13.536 atendimentos, 10.283 a mais do que o ano anterior (Vigilância Sanitária-RJ). Esses dados enfatizam a importância desta micose como um problema de saúde pública.

2 | DESVENDANDO A RESPOSTA IMUNE FRENTE A S. BRASILIENSIS

Pouco se sabe sobre a resposta imune frente a *Sporothrix* spp., bem como os receptores envolvidos no seu reconhecimento e fagocitose. O que se sabe é que os macrófagos desempenham papel importante no início, manutenção e resolução das respostas inflamatórias no hospedeiro. Primeiramente para que ocorra o estabelecimento da esporotricose, é requerida a transição dimórfica, onde os conídios transformam-se em leveduras (GUZMAN-BELTRAN et al., 2012). Quando os conídios entram em contato com os macrófagos, há uma baixa indução de resposta pró-inflamatória e morte celular induzida

por espécies reativas de oxigênio (ROS), quando comparada as leveduras. Assim, o fungo sobrevive e ocorre a transição dimórfica (GUZMAN-BELTRAN et al., 2012).

Em seguida temos a fagocitose, que é um importante mecanismo da imunidade inata na esporotricose. O processo inicial da fagocitose ocorre por meio do reconhecimento direto de componentes como a manose, mananas, β-glucanas e lipopolissacarídeo (LPS), ou componentes do soro que opsonizam os patógenos antes da sua internalização (DUNDERHILL & GANTNER, 2004). Os fagócitos agem como células regulatórias e efetoras do sistema imune, sendo que o aumento da função fagocítica pode ser aplicado como terapia contra infecções microbianas (POPOV et al*.,* 1999). Se uma falha nesse sistema ocorrer, há maior facilidade do microrganismo em se desenvolver no hospedeiro e intensificar o processo infeccioso. Ensaios de fagocitose mostraram que os macrófagos foram capazes de internalizar conídios opsonizados e não opsonizados e leveduras de *S. schenckii.* No reconhecimento de conídios, houve a participação de receptores de manose e o desenvolvimento de uma resposta Th1, já no reconhecimento de leveduras, houve a participação de receptores de complemento (GUZMAN-BELTRAN et al., 2012). O receptor de manose está principalmente relacionado a uma resposta Th1 e Th17 em fungos (ROMANI, 2011). Interessantemente, embora os conídios de *S. schenckii* sejam reconhecidos por receptores de manose, a resposta inflamatória induzida é fraca, no qual pode favorecer a transição dimórfica de conídios para leveduras. Após a ativação dos macrófagos, os mesmos fagocitam os patógenos invasores e promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como, IL-6, TNF-α e IL-1β. Isto estimula as respostas fagocíticas e promove a liberação de agentes tóxicos, tais como, compostos intermediários reativos de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), que é um potente mediador da resposta imune e inflamatória. O NO é produzido nos momentos iniciais da infecção, bem como no seu término, para a resolução total (CARLOS et al., 1994). Além dos macrófagos, a resposta imune inflamatória gerada por *S. schenckii* também foi estudada em outras células características da resposta inata, como os mastócitos (ROMO-LOZANO; HERNANDEZ-HERNANDEZ; SALINAS, 2014) e queratinócitos (LI et al., 2012). A interação de mastócitos com conídios e leveduras de *S. schenckii* conduziu a produção de TNF-α e IL-6, sendo que a via ERK foi ativada quando mastócitos foram desafiados com leveduras (ROMO-LOZANO; HERNANDEZ-HERNANDEZ; SALINAS, 2014). De forma semelhante, queratinócitos tratados com conídios e leveduras de *S. schenckii* proporcionaram aumento da expressão de RNAm de TLR-2 e TLR-4, e aumentaram os níveis de IL-6 e IL-8 por meio da sinalização por NF-kB (LI et al., 2012).

Estudos de resposta imune frente a fungos revelam diferenças associadas às espécies, bem como, ao estado imunológico do hospedeiro (CARLOS et al., 1994; FERNANDES et al., 2013), havendo a participação de vários mecanismos de defesa. Sabe-se que leveduras e conídios expressam em sua superfície estruturas microbianas conservadas, denominadas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs)

(AKIRA et al., 2001). Estas estruturas são reconhecidas por diferentes receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes nos macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (AKIRA et al., 2001). A seguir, temos um panorama dos principais estudos de resposta imune frente à *Sporothrix,* no entanto, a maioria deles relaciona-se a espécie *S. schenckii*. Esses estudos fornecem informações importantes para o direcionamento e condução do trabalho frente à espécie *S. brasiliensis*.

Para a compreensão do desencadeamento da resposta imune inata, é preciso conhecer a principal fonte e a natureza dos PAMPs em fungos de importância médica, bem como, os principais receptores envolvidos no seu reconhecimento. Os PAMPs podem variar quanto a sua natureza molecular, podendo ser lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos. Especificamente em fungos, a parede celular é a principal fonte de PAMPs, sendo que, os principais componentes são β-glucanas, quitina e mananas (ROMANI et al., 2011). Especificamente em leveduras de *S. schenckii*, a peptido-rhamnomanana é uma fração de glicoproteína composta de 33,5% de ramnomanose, 57% de manose e 14,2% galactose (LLOYD & BITTON, 1971). Os PAMPs podem ser reconhecidos por diferentes PRRs, tais como: receptores do tipo Toll (TLRs) (AKIRA et al., 2001). Células do exudato peritoneal de camundongos infectados com leveduras de *S. schenckii* cultivadas na presença de extrato lipídico proveniente do fungo promoveram um aumento de IL-18 e IL-1β, por meio da ativação da caspase-1, sugerindo a participação do inflamassoma e de receptores de domínio citosólico ologomerizado (NOD). Além disso, recentemente, verificou-se que a dectina-1 reconhece β-1,3-glucana e outros componentes fúngicos de *S. schenckii*, aumentando a liberação de citocinas durante a infecção (JELLMAYER et al., 2017). Os TLRs são encontrados nas células do sistema imunológico e o seu papel tem sido amplamente estudado no reconhecimento de fungos. Eles fazem parte de uma família de receptores transmembrânicos evolutivamente conservados que contêm um domínio externo a membrana com sequências ricas em leucina particulares para cada TLR (PANDEY et al., 2015). Até o presente momento, 10 e 12 membros dessa família foram identificados em humanos e camundongos, respectivamente (PANDEY et al., 2015). A proteína Toll foi inicialmente descrita na mosca das frutas, *Drosophilla melanogaster*, como um receptor transmembrana tipo I, composto de repetições ricas em leucina e com um papel importante no desenvolvimento dorso-ventral dos embriões dessas moscas. Lemaitre et al. (1996), descreveram primeiramente a relação do Toll com a defesa em *Drosophila* sp. A ausência do receptor *Toll* nas moscas promoveu a rápida morte das mesmas, após o contato com agulhas contaminadas com uma suspensão de conídios de *Aspergillus fumigatus* (LEMAITRE et al., 1996). Em seguida, um homólogo deste receptor (conhecido como *Toll-like receptor* 4–TLR-4) foi encontrado em mamíferos, estando relacionado à indução da expressão de genes envolvidos nas respostas inflamatórias (MEDZHITOV et al., 1997).

Após o reconhecimento de estruturas microbianas pelos TLRs, estes receptores sofrem mudanças conformacionais permitindo o recrutamento de moléculas adaptadoras.

São elas: Fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88), proteína adaptadora de MyD88 (MAL/TIRAP), domínio TIR (TRIF/ TICAM-1) e a molécula adaptadora de TRIF (TRAM) (TAKEUCHI & AKIRA, 2010). O tipo de sinalização depende de diferentes combinações de moléculas adaptadoras. A sinalização intracelular está dividida em 2 vias e depende primariamente do adaptador utilizado: Via dependente de MyD88 ou Via dependente de TRIF. Com exceção de TLR-3, todos os membros usam a via MyD88 para ativação do fator de transcrição NF-kB (fator nuclear kB) e das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitogênese) para a indução de genes pró-inflamatórios (PANDEY et al., 2015).

A ativação dependente da molécula MyD88 é iniciada com a facilitação da associação da MyD88 com a IRAK4. Isso favorece a fosforilação de IRAK1, que permite a ligação da molécula TRAF6 ao complexo que por sua vez, ativa TAK1 que faz um complexo com TAB1 e TAB2. Após a formação do complexo, TAK1 ativa o complexo IKK que leva a ativação de NF-kB. Simultaneamente, TAK1 ativa dois membros das MAP quinases que subsequentemente ativam JUN N-terminal quinase (JNK) e p38, induzindo a produção de citocinas inflamatórias. Os receptores TLR-2 e TLR-4 necessitam, além da MyD88, da molécula adaptadora TIRAP (PANDEY et al., 2015).

Em modelos de doenças infecciosas, quando há perturbação na sinalização por MyD88, há uma diminuição da indução da resposta imune inata e adaptativa, aumentando a sensibilidade do hospedeiro à infecção. Por exemplo, em modelos de infecção de fungos como *C. albicans* e *A. fumigatus*, a deficiência de MyD88 provoca bloqueio na produção precoce de citocinas pró-inflamatórias, diminuição do recrutamento de neutrófilos e diminuição da ativação de células T (BELLOCCHIO et al., 2004). Bellochio et al., (2004), mostraram que as vias dependentes de MyD88 são fundamentais para a imunidade contra fungos. Uma vez que diferentes TLRs podem ser simultaneamente recrutados dependendo da espécie fúngica, morfologia e sítio de infecção envolvidos, a sinalização por MyD88 participa extensivamente na resposta inata contra diferentes patógenos. Além disso, estas vias também são necessárias para o desenvolvimento de respostas adaptativas do tipo Th1, que são protetoras em diversas micoses.

A ausência do receptor TLR-2 está relacionada a uma maior susceptibilidade à candidíase disseminada em modelos murinos devido a uma diminuição na secreção de TNF-α e MIP-2 e recrutamento de neutrófilos (BELLOCCHIO et al., 2004). Em contraste, outros estudos mostraram que camundongos TLR-2-/- são mais resistentes a candidíase sistêmica, exibindo um aumento na quimiotaxia e secreção de IFN-γ, diminuição na secreção de IL-10, bem como, no número de células Treg CD4+ CD25+. Interessantemente, o recrutamento de monócitos aumentou em camundongos TLR-2-/-, sugerindo um aumento da atividade anti-*Candida* nesses animais (NETEA et al., 2004). A imunossupressão em camundongos TLR-2-/- resultou em maior susceptibilidade a infecções por *Aspergillus* (BALLOY et al., 2005); no entanto, o polimorfismo de TLR-2 não resultou em aspergilose invasiva (CUNHA et al., 2013). Além de estar envolvido no reconhecimento de células

fúngicas, TLR-2 também está presente nos mecanismos de resposta do hospedeiro a outros microrganismos como *Staphylococcus, Mycobacterium* e *Pneumococcus* (KOEDEL et al., 2003). Na avaliação de seu papel na infecção por leveduras de *S. schenckii*, observou-se que, na ausência desse receptor, houve uma menor taxa de fagocitose e menor produção de citocinas como TNF-α, IL-1β, IL-12 e IL-10 frente a antígenos lipídicos. Isso revela o papel desse receptor no desenvolvimento da proteção em resposta a esse microrganismo, induzindo a produção de mediadores em resposta ao fungo *S. schenckii* (NEGRINI et al., 2013).

TLR-4 é o receptor que está envolvido no reconhecimento de LPS, um componente da parede celular de bactérias gram-negativas causadoras de choque séptico (KAWAI et al., 2010). Alguns estudos mostram seu envolvimento no reconhecimento de fungos. Camundongos nocautes para TLR-4 são mais suscetíveis a candidíase sistêmica devido à deficiência na secreção de citocinas e diminuição do recrutamento de neutrófilos, o que resulta no aumento da carga fúngica nos rins (NETEA et al., 2002). TLR-4 nocautes são mais suscetíveis a infecções por *Aspergillus,* sendo que polimorfismos nesse receptor estão associados a desenvolvimento de aspergilose invasiva (BOCHUD et al., 2008). No caso da esporotricose, resultados similares aos obtidos na ausência de TLR-2, foram observados na ausência de TLR-4. O TLR-4 é ativado em resposta a componentes lipídicos de *S. schenckii*, promovendo uma resposta imune mais eficiente. Por outro lado, macrófagos provenientes de animais nocautes em TLR-4 foram incapazes de produzir altos níveis de citocinas, tais como, IL-1β, IL-12 e TNF-α. Esses dados evidenciam a importância desse receptor na imunidade frente a *S. schenckii* (SASSÁ et al., 2012).

No que se refere ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa, a predominância de subpopulações de células T (Th1, Th2 ou Th17) durante uma infecção é extremamente importante, uma vez que cada eixo é mais eficiente no combate a determinadas classes de patógenos (PANDEY et al., 2015). As respostas do tipo Thl promovem a liberação de IFN-γ, um forte ativador de macrófagos (PANDEY et al., 2015), de fundamental importância na patogênese da esporotricose sendo que sua ativação diferencial é responsável por manifestações clínicas variadas (PANDEY et al., 2015). Em algumas doenças crônicas, entretanto, a resposta celular de linfócitos T $CD4^+$ é inapropriada e pode exacerbar a doença, impedindo a erradicação do microrganismo. Infecções fúngicas em humanos e em modelos animais indicam que a imunidade celular é crucial para a defesa do hospedeiro, potencializando respostas fungistáticas e fungicidas, como a produção de reativos de oxigênio (ROS), em especial o ânion superóxido e seus metabólitos reativos. Consequentemente, a ausência de uma resposta adaptativa adequada está relacionada a uma maior letalidade, comprovada em modelos murinos de infecção (KAJIWARA et al., 2004). A ativação das células Th1 parece ser determinada em parte pela resposta de células dendríticas (DCs) frente a antígenos fúngicos específicos, provenientes de isolados de lesões cutâneas ou viscerais de esporotricose causada por *S. schenckii*. Tratando DCs com

conídios de *S. schenckii* ou com leveduras provenientes de lesão cutânea, houve indução da produção de IFN-γ por células T, com ativação da via ERK, sugerindo uma resposta Th1. No entanto, antígenos provenientes de lesão visceral aumentaram a produção de IL-4, uma citocina da imunidade humoral (PANDEY et al., 2015).

As células Th17 têm ganhado destaque dado ao papel chave na defesa contra bactérias e fungos extracelulares, apresentando efeitos tanto protetores quanto deletérios (HERNÁNDEZ-SANTOS & GAFFEN, 2012). A resposta Th17, com a secreção de IL-17, promove atividades pró-inflamatórias, incluindo o recrutamento de neutrófilos e produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais. Utilizando modelo experimental murino verificou-se que a ausência dessas respostas está relacionada a uma maior letalidade (KAJIWARA et al., 2004). O papel de células Th17 é conhecido para a eliminação do *S. schenckii* em camundongos com infecção sistêmica, uma vez que a depleção de IL-23 conduz a um aumento da carga fúngica (FERREIRA et al., 2015). Estudos *in vitro* mostram que as DCs reconhecem antígenos de *S. schenckii* e conduzem ao desenvolvimento de um padrão misto Th1/Th17 (VERDAN et al., 2012). Sabe-se que o exoantígeno de *S. schenckii* é capaz de aumentar níveis de citocinas inflamatórias produzidos por macrófagos e DCs. Consequentemente, a co-incubação de células T com DCs ativadas por exoantígeno provocam um padrão de citocinas Th1 / Th17 (IFN-γ/Th17, IL-23 e TGF-β, respectivamente) (VERDAN et al., 2012).

Há uma série de evidências que indicam que os anticorpos protetores e as células CD4+ Th1 e Th17 são elementos fundamentais na resposta imune frente a *S. schenckii* (FERREIRA et al., 2015; VERDAN et al., 2012; LIU et al., 2016). Estudos mostram que não só o IFN-γ é secretado durante a imunização passiva, mas que IL-10 e IL-4 também aumentaram durante o período de infecção, sugerindo um padrão misto de resposta Th1 / Th2 (ALMEIDA et al., 2015).

Além do exoantígeno, peptídeo-polissacarídeo extraído da parede celular de leveduras de *S. schenckii* é capaz de induzir um padrão misto de resposta (Th1/Th2), havendo ativação de macrófagos por meio da via clássica (M1), com secreção de IL-12 e resposta Th1, bem como, macrófagos da via alternativa (M2), com altos níveis de IL-10, estando associados a uma resposta Th2 (ALEGRANCI et al., 2013). Analisando a literatura acima descrita, verifica-se que um padrão misto de respostas (Th1, Th2, Th17) pode ser observado na resposta frente a *S. schenckii.* O que se sabe é que as respostas Th1 e Th17, são fatores-chave no controle da infecção por fungos, especialmente na patogênese da esporotricose causada por *S. schenckii.* No entanto, pouco se sabe a respeito da espécie *S. brasiliensis.*

As respostas imunes celulares e humorais estão ligadas ao perfil de citocinas gerado. Os sinais de ativação mais fortes que direcionam a diferenciação de células T para a linhagem Th2 são desencadeados por IL-4 e IL-13, com uma diminuição concomitante na resposta Th1. Uma característica da resposta Th2 é a secreção de anticorpos. Dependendo

da forma clínica da esporotricose verifica-se um perfil diferente de anticorpos. Isso foi sugerido pela observação de que 15 a 20 antígenos na faixa de 22 a 70 kDa presentes em uma solução solúvel de extrato peptídico do fungo foram reconhecidos pelos soros de pacientes com esporotricose extracutânea, enquanto soro de pacientes com esporotricose cutânea reconheceram apenas 8-10 antígenos (PANDEY et al, 2015). Sabe-se que além das diferentes formas clínicas, existem outros determinantes para a especificidade ou intensidade de anticorpos contra antígenos de *Sporothrix* spp*,* tal como, diferenças relacionadas as espécies.

Almeida-Paes et al. (2012), mostraram que isolados de *S. brasiliensis* provenientes de diferentes formas clínicas apresentaram o mesmo padrão antigênico. No entanto, quando comparada a resposta de anticorpos induzida por *S. brasiliensis* isolado de um paciente com a forma linfocutânea, com a resposta induzida por *S. schenckii* isolado da mesma forma clínica, o perfil era diferente, sugerindo que as diferentes espécies do complexo *Sporothrix* são responsáveis por respostas específicas. Duas moléculas antigênicas glicoproteicas, nomeadas gp70 e gp 60, foram descritas em *S. schenckii* (RUIZ-BACA et al., 2014). A gp60 encontra-se principalmente na parede celular de leveduras de três diferentes espécies do complexo *Sporothrix*: *S. schenckii* strictu sensu, *S. brasiliensis* e *S. globosa*. Ela mostrou ser imunodominante já que foi reconhecida pelo soro de camundongos infectados com cepas do complexo *S. schenckii* (FERNANDES et al., 2013). Rodrigues et al. (2015) mostraram que a gp70 sofre modificações pós-traducionais, provavelmente glicosilação e substituição de aminoácidos, uma vez que pelo menos seis proteínas variando de 60 a 70 kDa compartilharam o mesmo peptídeo, assim, após análises por espectrometria de massa, conclui-se que gp60 e gp70 eram o mesmo antígeno.

Apesar da observação de que gp60 e gp70 compartilham o mesmo peptídeo, o padrão de glicosilação pode influenciar significativamente o tipo de resposta inicial desencadeada após o reconhecimento pelos receptores das células de resposta imune. Soros de camundongos infectados com *S. schenckii* apresentaram anticorpos específicos contra a proteína de 70 kDa, principalmente isotipos IgG1 e IgG3, sugerindo que gp70 induz uma forte resposta humoral (NASCIMENTO et al., 2008). Além disso, a imunização passiva com anticorpo monoclonal específico anti-gp70, modificou o curso da infecção causada por *S. schenckii* em camundongos BALB/c, diminuindo a carga fúngica e aumentando a produção de IFN-γ, um efeito observado até mesmo em camundongos deficiente em células T (NASCIMENTO et al., 2008). Mesmo que o maior interesse esteja focado nas isoformas gp60-gp70, recentemente Portuondo-Fuentes et al. (2016) mostraram que a transferência passiva de soro de camundongos imunizados contendo anticorpos contra duas proteínas de *S. schenckii* de 44 e 47 kDa tem um papel protetor durante a esporotricose experimental.

Os receptores TLR-2 e TLR-4 são importantes no desencadeamento da resposta imune por macrófagos *in vitro* frente a *S. brasiliensis*. A análise *in vivo* demonstra que a ausência de TLR-2 e TLR-4, prejudica o desenvolvimento de uma resposta Th1 principalmente

nos primeiros 14 dias de infecção. Após 28 dias de infecção, especificamente para TLR-2-/-, ocorre o desencadeamento de uma resposta padrão Th17 e quando observada a ausência de TLR-4, o aumento da citocina IL-6, sugerindo mecanismos de controle da esporotricose. Um dado interessante a ser notado é que a ausência de um receptor provavelmente faz com que o sistema imune venha utilizar outras vias de sinalização na tentativa de combater o patógeno, o que não exclui a possibilidade de outros receptores estarem envolvidos na resposta induzida pelo fungo *S. brasiliensis*. Uma vez que grande parte dos fungos que são reconhecidos TLR-2 e também são reconhecidos pelo TLR-4, seria significativo avaliar o sinergismo entre esses dois TLRs no contexto da infecção fúngica por *S. brasiliensis*.

REFERÊNCIAS

ALEGRANCI, P.; RIBEIRO, L.C.; FERREIRA, L.S.; NEGRINI, T.; MAIA, D.C.; TANSINI, A.; GONÇALVES, A.C.; PLACERES, M.C.; CARLOS, I.Z. **The predominance of alternatively activated macrophages following challenge with cell wall peptide-polysaccharide after prior infection with *Sporothrix schenckii***. Mycopathologia, v.176, p.57–65, 2013.

ALMEIDA, J.R.; KAIHAMI, G.H., JANNUZZI, G.P.; ALMEIDA, S.R. **Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis***. Medical Mycology, v.53, p.42–50, 2015.

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. **Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity**. Nature Immunology, v.2, p.675–680, 2001.

BALLOY, V.; SI-TAHAR, M.; TAKEUCHI, O.; PHILIPPE, B.; NAHORI, M.A.; TANGUY, M.; HUERRE, M.; AKIRA, S.; LATGÉ, J.P.; CHIGNARD, M. **Involvement of Toll-Like Receptor 2 in experimental invasive pulmonary aspergillosis**. Infection & Immunity, n.9, p.5420–5425, 2005.

BELLOCCHIO, S.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; ROSSI, G.; MAMBULA, S.S.; VECCHI, A.; MANTOVANI, A.; LEVITZ, S.M.; ROMANI, L. **The contribution of the Toll-Like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo***. Journal of Immunology, v.172, n.5, p.3059–3069, 2004.

BARROS, M.B.; ALMEIDA-PAES, R.; SCHUBACH, A.O. ***Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis**. Clinical Microbiology Reviews, v.24, n.4, p. 633-654, 2011.

BOCHUD, P.Y.; CHIEN, J.W.; MARR, K.A.; LEISENRING, W.M.; UPTON, A.; JANER, M.; RODRIGUES, S.D.; LI, S.; HANSEN, J.A.; ZHAO, L.P.; ADEREM, A.; BOECKH, M. **Toll-like receptor 4 Polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation.** New England Journal of Medicine, v.359, n.17, p.1766–1777, 2008.

CARLOS, I.Z.; ZINI, M.M.; SGARBI, D.B.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L. **Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis**. Mycopathologia, v.127, p.189–194, 1994

CUNHA, C.; AVERSA, F.; ROMANI, L.; CARVALHO, A. **Human genetic susceptibility to invasive aspergillosis.** PLoS Pathogens, v.9, n.8, p.3434, 2013.

DUNDERHILL, B.; GANTNER. **Integration of toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity.** Microbes Infection, v. 6, p. 1368 –1373, 2004.

FERNANDES, G.F.; DOS SANTOS, P.O.; RODRIGUES, A.M.; SAZAKI, A.A.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z.P. **Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species**. Virulence, v.4, p.241–249, 2013.

FERREIRA, C.P.; OLIVEIRA DE ALMEIDA, A.C.; CORTE-REAL, S. **Transmission Electron Microscopy Analysis of Skin Lesions from Sporotrichosis Epidemic in Rio de Janeiro, Brazil.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 92, n. 2, p. 215–216, 2015.

GALHARDO, M.C.G. **Esporotricose zoonótica no Rio de Janeiro ainda sem controle**. Bol. Informativo, Soc. Infectol. Rio de Janeiro, v.34, p.3-5, 2011.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. **Developments in fungal taxonomy.** Clinical microbiology reviews, v.12, n.3, p.454–500, 1999.

GUZMAN-BELTRAN, S.; PEREZ-TORRES, A.; CORONEL-CRUZ, C.; TORRES- GUERRERO, H. **Phagocytic receptors on macrophages distinguish between different *Sporothrix schenckii* morphotypes**. Microbes Infection, v.14, p.1093–1101, 2012.

HERNÁNDEZ-SANTOS, N.; GAFFEN, S.L. **Th17 Cells in Immunity to *Candida albicans***. Cell Host & Microbe., v. 11, n. 5, p. 425–435, 2012.

JELLMAYER, J.A.; FERREIRA, L.S.; MANENTE, F.A.; GONÇALVES, A.C.; POLESI, M.C.; BATISTA-DUHARTE, A.; CARLOS, I.Z. **Dectin-1 expression by macrophages and related antifungal mechanisms in a murine model of *Sporothrix schenckii* sensu stricto systemic infection**. Microbes Pathogens, v.110, p.78-84, 2017.

KAJIWARA, H.; SAITO, M.; OHGA, S.; UENOTSUCHI, T.; YOSHIDA, S. **Impaired Host Defense against *Sporothrix schenckii* in Mice with Chronic Granulomatous Disease**. Infection & Immunity, v.72, n.9, p.5073–5079, 2004.

KAWAI, T.; AKIRA, S. **The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors**. Nature Immunology, v.11, p.373–384, 2010

KOEDEL, U.; ANGELE, B.; RUPPRECHT, T.; WAGNER, H.; ROGGENKAMP, A.; PFISTER, H.W.; KIRSCHNING, C.J. **Toll-Like Receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental Pneumococcal meningitis**. The Journal of Immunology, v.170, n.1, p.438–444, 2003.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. **Subcutaneous and Deep Mycoses - Sporotrichosis.** Medical Mycology, p.707–729, 1992.

LACAZ, C.S. **Guia para identificação: fungos actinomicetos algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J.M.; HOFFMANN, J.A. **The dorso ventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults**. Cell, v. 86, p. 973–983, 1996.

LI, M.; CHEN, Q.; SUN, J.; SHEN, Y.; LIU, W. **Inflammatory response of human keratinocytes triggered by *Sporothrix schenckii* via toll like receptor 2 and 4**. The Journal of Dermatological Science, v.66, p.80–82, 2012.

LLOYD, K.O.; TRAVASSOS, L.R. **Immunochemical studies on L-rhamno-D-mannans of *Sporothrix schenckii* and related fungi by use of rabbit and human antisera.** Carbohydrates Research, v. 40, n.1, p. 89–97, 1975.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; DOS SANTOS LAZÉRA, M.; GUARRO, J. **Molecular Phylogeny of *Sporothrix schenckii***. Journal of Clinical Microbiology, v.44, n.9, p.3251–3256, 2006.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M.; GUARRO,J. ***Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest.** Journal Clinical Microbiology, v.45, n.10, p. 3198-3206, 2007.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A.J.R. **A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity**. Nature, v. 388, p. 394–397, 1997.

MEYER, E.M.; DE BEER, Z.W.; SUMMERBELL, R.C.; MOHARRAM, A.M.; DE HOOG, G.S.; VISMER, H.F.; WINGFIELD, M.J. **Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the Ophiostoma stenoceras-*Sporothrix schenckii* complex.** Mycologia, v.100, n.4, p.647–661, 2008.

MIRANDA, L.H.M.; SANTIAGO, M.A.; SCHUBACH, T.M.P.; MORGADO, F.N.; PEREIRA, S.A.; OLIVEIRA, R.V.C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. **Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of CD8 low cells and a decrease in CD4$^+$ cells.** Medical Mycology, v.54, n.1, p.29-39, 2016.

MONTENEGRO, H.; RODRIGUES, A.M.; DIAS, M.A.; DA SILVA, E.A.; BERNARDI, F.; DE CAMARGO, Z. **Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in Sao Paulo, Brazil**. BMC Veterinary Research, v.10, n.269, p. 014-0269, 2014.

NASCIMENTO, R.C.; ESPÍNDOLA, N.M.; CASTRO, R.A.; TEIXEIRA, P.A.; LOUREIRO, Y.; PENHA, C.V.; LOPES-BEZERRA, L.M.; ALMEIDA, S.R. **Passive immunization with monoclonal antibody against 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis.** European Journal Immunology, v.30, p.3080–3089, 2008.

NEGRINI, T.D.C.; FERREIRA, L.S.; ALEGRANCI, P.; ARTHUR, R.A.; SUNDFELD, P.P.; MAIA, D.C.G.**Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii***. Immunology Investigation, v.42, p.36–48, 2013.

NETEA, M.G.; SUTMULLER, R.; HERMANN, C.; VAN DER GRAAF, C.A.; VAN DER MEER, J.W.; VAN KRIEKEN, J.H.; HARTUNG, T.; ADEMA, G.; KULLBERG, B.J. **Toll-Like Receptor 2 Suppresses Immunity against *Candida albicans* through Induction of IL-10 and Regulatory T Cells**. The Journal of Immunology, v. 172, n. 6, p. 3712–3718, 2004.

PANDEY, S.; KAWAI, T.; AKIRA, S**. Microbial sensing by toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors.** Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v.5, n.1, p.162-46, 2015.

PEREIRA, S.A.; GREMIÃO, I.D.; KITADA, A.A.; BOECHAT, J.S.; VIANA, P.G.; SCHUBACH, T.M. **The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.47, n.3, p.392–393, 2014.

PORTUONDO, D.L.; BATISTA-DUHARTE, A.; FERREIRA, L.S.; MARTÍNEZ, D.T.; POLESI, M.C.; DUARTE, R.A.; DE PAULA E SILVA, A.C.; MARCOS, C.M.; ALMEIDA, A.M.; CARLOS, I.Z. **A cell wall protein-based vaccine candidate induce protective immune response against *Sporothrix schenckii* infection.** Immunobiology, v.221, n.2, p. 300-309, 2016.

POPOV, S.V.; POPOVA, G.Y.; OVODOVA, R.G.; BUSHNEVA, O.A.; OVODOV, Y.S. **Effects of polydaccharide from *Silene vulgaria* on phagocytes.** Internation Journal Immunopharmacology, v. 21, p. 617–24, 1999.

RODRIGUES, A.M.; FERNANDES, G.F.; ARAUJO, L.M.; DELLA TERRA, P.P.; DOS SANTOS, P.O.; PEREIRA, S.A.; SCHUBACH, T.M.; BURGER, E.; LOPES-BEZERRA, L.M.; DE CAMARGO, Z.P. **Proteomics-based characterization of the humoral immune response in sporotrichosis: toward discovery of potential diagnostic and vaccine antigens.** PLoS Negleted Tropical Disease, v.25, p.0004016, 2015.

RUIZ-BACA, E.; HERNANDEZ-MENDOZA, G.; CUELLAR-CRUZ, M.; TORIELLO, C.; LOPEZ-ROMERO, E.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G. **Detection of two immunoreactive antigens of the cell wall of *Sporothrix brasiliensis* and *S. globosa***. Diagnostic Microbiology Infection Disease, v.79, p.328–330, 2014.

ROMANI, L. **Immunity to fungal infections**. Nature Reviews Immunology, v.4, p.1–13, 2004.

ROMO-LOZANO, Y.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, F.; SALINAS, E. ***Sporothrix schenckii* yeasts induce ERK pathway activation and secretion of IL-6 and TNF-α in rat mast cells, but no degranulation**. Medical Mycology, v.52, p.862–868, 2014.

SASSÁ, M.F.; FERREIRA, L.S.; ABREU-RIBEIRO, L.C.; CARLOS, I.Z. **Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice.** Mycopathologia, v.174, p. 21–30, 2012.

TAKEUCHI, O; AKIRA, S. **Pattern Recognition Receptors and Inflammation**. Cell, v.140, n.6, p.805–820, 2010.

VERDAN, F.F.; FALEIROS, J.C.; FERREIRA, L.S.; MONNAZZI, L.G.; MAIA, D.C.; TANSINE, A.; PLACERES, M.C.; CARLOS, I.Z.; SANTOS-JUNIOR, R.R. **Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens promote Th1/Th17 response *in vitro*.** Immunobiology, v. 217, n. 8, p. 788–794, 2012.

CAPÍTULO 13

PRESENÇA DE PARASITOSES EM TOMATES (*Solanum lycopersicum*) COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS LIVRES DE SANTARÉM – PA

Data de aceite: 19/01/2021
Data de submissão: 06/11/2020

Luana Caroline Frota da Conceição
Centro Universitário da UNAMA
Santarém-Pará/Brasil

Lília Maria Nobre Mendonça de Aguiar
UFPA
Laboratório LACON
Santarém-Pará/Brasil
http://lattes.cnpq.br/3149704261770731

Domingas Machado da Silva
Universidade Federal do Oeste do Pará
Santarém-Pará/Brasil
http://lattes.cnpq.br/5202168262491743

Jocireudo de Jesus Carneiro Aguiar
Universidade Federal do Pará (UFPA)
Centro Universitário da Amazônia
Santarém-Pará/Brasil
http://lattes.cnpq.br/0630231948597108

Edson Alves Menezes Júnior
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)
http://lattes.cnpq.br/9360321537729670

Bruna Jaqueline Sousa da Silva
Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)
Instituto esperança de Ensino Superior (IESPES)
http://lattes.cnpq.br/2464934900800010

RESUMO: INTRODUÇÃO: Há muitos anos as hortaliças frescas, especialmente os tomates (*Solanum lycopersicum)* estão presentes na dieta de muitas pessoas devido seus valores nutricionais, preparo simples e baixo custo de produção. Apesar de todo o benefício nutricional das hortaliças, estas podem veicular diversos tipos de parasitos capazes de provocar doenças em seres humanos. **OBJETIVO:** Este estudo tem como objetivo verificar, identificar e quantificar a presença de parasitas em tomates (*Solanum lycopersicum)* produzidos e comercializados em feiras livres do município de Santarém, localizado no interior do Pará. **METODOLOGIA:** Foram coletadas dez amostras de quatro feiras livres localizada na área urbana do município, totalizando quarenta amostras. As amostras foram lavadas individualmente e o líquido obtido foi analisado por sedimentação e flutuação. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Não houve nenhum tipo de contaminação parasitológica nas amostras. Os resultados alcançados neste estudo revelam que os agricultores e vendedores estão agindo corretamente no cultivo e manejo dos tomates, apesar de ser possível encontrar déficits na infraestrutura e saneamento básico nas feiras livres do município. **CONCLUSÃO:** Mais estudos com este mesmo objetivo devem ser realizados, não somente com tomates, mas, envolvendo outras olerícolas, para assim ser alcançado, de fato, resultados concretos.

PALAVRAS-CHAVE: Tomates. Infecção. Feira Livre.

PRESENCE OF PARASITOSES IN TOMATOES (SOLANUM LYCOPERSICUM) MARKED FREE FEIRS IN THE SANTARÉM – PA

ABSTRACT: INTRODUCTION: For many years' fresh vegetables, especially tomatoes (Solanum lycopersicum) have been present in many people's diet due to their nutritional values, simple preparation and low production cost. Despite all the nutritional benefit of vegetables, they can carry several types of parasites capable of causing disease in humans. **OBJECTIVE**: This study aims to verify, identify and quantify the presence of parasites in tomatoes (Solanum lycopersicum) produced and sold in free markets in the municipality of Santarém, located in the interior of Pará. **METHODOLOGY**: Ten samples were collected from four fairs located in the urban area of the municipality, totaling forty samples. The samples were washed individually, and the liquid obtained was analyzed by sedimentation and flotation. **RESULTS AND DISCUSSION**: There was no type of parasitological contamination in the samples. The results achieved in this study reveal that farmers and vendors are acting correctly in the cultivation and management of tomatoes, although it is possible to find deficits in infrastructure and basic sanitation in free markets in the municipality. **CONCLUSION**: More studies with this same objective must be carried out, not only with tomatoes, but, involving other olerícolas, to achieve concrete results.

KEYWORDS: Tomatoes. Infection. Free Trade Fair.

INTRODUÇÃO

Devido ao aumento de surgimento de doenças crônicas e a preocupação das pessoas em uma melhor qualidade de vida a busca constante por uma alimentação saudável tem crescido nas últimas décadas. Com isso, a inserção de alimentos de origem vegetal nas mesas dos brasileiros torna-se imprescindível para uma boa qualidade de vida (COELHO, ROSA, LIMA, 2007).

Há muitos anos as hortaliças frescas, especialmente os tomates (*Solanum lycopersicum)* estão presentes na dieta de muitas pessoas devido seus valores nutricionais, preparo simples e baixo custo de produção. Apesar de todo o benefício nutricional das hortaliças, estas podem veicular diversos tipos de parasitos capazes de provocar doenças em seres humanos. Atualmente, doenças transmitidas por alimentos (DTA) representa um dos problemas de saúde pública mais frequentes mundialmente, especialmente em populações de baixa renda, desprovidas de infraestrutura de saneamento básico (AYERS et al., 2009; TURBINO, 2014).

As DTA's podem ser resultantes das más condições sanitárias na produção, armazenamento, transporte, manipulação e venda das hortaliças. Além disso, em muitas situações as hortaliças são frequentemente adubadas com dejetos animais ou irrigados com águas contaminadas com material fecal de origem humana e/ou animal, fatores que aumentam a incidência de doenças por parasitas intestinais (BENTO et al, 2012; DIAS e GAZZINELLI, 2014).

Segundo Neves (2005), os agentes mais comuns de entoparasitoses são os

protozoários *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia,* os helmintos *Ascaris lumbricoides, Taenia solium*, *Taenia saginata*, ancilostomídeos, *Trichuris trichiura, Strongyloides stercoralis, Enterobius vermicularis* e *Schistosoma mansoni*. Esses, parasitas causam, principalmente em crianças, má-absorção dos alimentos, diarreia crônica, anemia, desnutrição, dores abdominais e depauperamento físico e mental, resultando em baixo rendimento escolar, retardamento no crescimento e na mentalidade dos indivíduos acometidos (BENTO et al, 2012).

O rastreamento das possíveis fontes de contaminação destes alimentos permite difundir informações para a prevenção da contaminação entre manipuladores de alimentos e produtores, promovendo a segurança alimentar. No entanto, este cenário compreende um grande desafio para os sanitaristas dos países em subdesenvolvidos (SOARES, CANTOS, 2005).

Acredita-se que, em Santarém-PA, uma grande parte da população sofra com a falta de rede de esgoto, água tratada e controle sanitário dos alimentos comercializados em feiras livres, com isso, torna-se propício a disseminação de infecções parasitárias. Nesse sentido, surge o seguinte problema: existe a possibilidade de parasitas estarem presentes nos tomates comercializados nas feiras livres de Santarém? Para isso, a presente pesquisa tem como objetivo verificar, identificar e quantificar a presença de parasitas em tomates produzidos no município de Santarém, localizado no interior do Pará e, comercializados em feiras livres do município.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de metodologia quantitativa, explicativa e de delineamento transversal, onde os dados coletados foram analisados quantitativamente, a partir de uma abordagem laboratorial para obtenção de resultados.

Para levantamento desses dados foram coletadas um total de quarenta (40) amostras de tomates (*Solanum lycopersicum*), sendo dez (10) amostra de cada local, de quatro (4) feiras livres do município de Santarém – Pa, no período de **setembro** a **outubro** de 2019.

As amostras foram acondicionadas, individualmente, em sacolas plásticas descartáveis e, logo em seguida, foram levadas para análise no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário da Amazônia (UNAMA). No laboratório as análises foram realizadas no mesmo dia, com os resultados obtidos em até 24 horas após a sua chegada ao laboratório.

As análises foram baseadas nos protocolos de sedimentação (*Hoffmann*, Pons e Janer), indicado para procura de ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários; e no método de flutuação (*Willis*), apropriado para pesquisas de ovos leves (ancilostomídeos), adaptado (ROCHA, MENDES, BARBOSA, 2008).

No método de sedimentação, as amostras foram processadas individualmente em

cubas de plástico. Cada amostra foi lavada com volume de 350 ml de água destilada. O líquido obtido foi colocado em cálice de sedimentação, e após repouso de 24 horas, parte do sedimento foi corado com Lugol.

As análises foram em triplicata e as observações em microscópio óptico. No método de flutuação as amostras foram lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), e após repouso de 30 minutos foram coradas com Lugol para análise microscópica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O consumo de olerícolas, atualmente, está associado a uma gama de benefícios à saúde, com resultados diretos na melhoria da qualidade de vida de seus consumidores. Por esta razão, existe um incentivo para que estes alimentos sejam consumidos, principalmente na forma *in natura*, o que causa a exposição de seus consumidores às formas transmissíveis de parasitas, uma vez que ao serem consumidos crus podem servir como via de transmissão, caso a higienização não tenha sido adequada. Esses parasitas são prejudiciais à saúde, podendo prejudicar no equilíbrio nutricional, além de causar algumas complicações sistêmicas como diarreias, anemias, hemorragias, obstrução intestinal, prolapso retal, entre outros (CANTOS et al, 2004; MONTANHER, CORANDIN, SILVA, 2007).

Nesta pesquisa não houve nenhuma contaminação parasitológica nos tomates analisados. Este fato pode ser justificado pelas características anatômicas a nível de textura da fruta, que não favorecem a retenção de microrganismos, fato que não acontece facilmente com outras frutas e olerícolas. Este fato pode estar relacionado, também, a ocorrência de higienização prévia destes, conforme relato dos feirantes. Esses dados reforçam com os achados de Resende et al (2014), que também mostraram ausência de formas infectantes de parasitas em tomates comercializados na região de Araxá (MG).

Na região metropolitana de Curitiba (PR) foi avaliada a qualidade sanitária de hortaliças orgânicas comercializadas na região. Dentre as amostras de olerícolas, não foram detectadas parasitas em nenhuma amostra de tomate analisado (ARBOS et al, 2010).

Contrariamente, em Minas Gerais pesquisou-se a presença de parasitas em olerícolas produzidas no norte do estado. Foram analisadas 05 amostras e todos os tomates analisados continham algum tipo de estrutura parasitária. Observou-se a presença de cistos de *Entamoeba coli* e *Giardia lamblia*, ovos de Ancilostomídeos, larvas de *Strongyloides stercoralis*, Ancilostomídeos e protozoários ciliados semelhantes à *Balantidium col.* Isso reforça o baixo padrão higiênico em algumas das etapas do manejo das olerícolas de agricultores da região norte de Minas Gerais (BENTO et al, 2012).

Achados de contaminação são encontrados em outros estudos realizados pelo Brasil, levando a considerar que os cuidados praticados no cultivo e manuseio desses olerícolas podem influenciar no controle sanitário desses alimentos, no entanto a literatura

relata poucos dados sobre contaminação parasitológica de tomates, há mais estudos que mostram relatos de contaminação em outros tipos de hortaliças, sendo o alface (*Lactuca Sativa)* o mais citado, como nos mostra Montanher, Corandin e Silva (2007), onde em seu estudo buscou a presença de enteroparasitos em alfaces prontas para o consumo servidas em restaurantes de Curitiba (PR). Em seu estudo, foram analisadas 50 amostras e de todas as alfaces analisadas, 10% (5 amostras) apresentaram-se contaminadas por estruturas parasitárias.

Apesar de nesse estudo não terem sidos encontrados nenhuma estrutura parasitológica, reforça-se os cuidados que devem ser tomados no cultivo e manuseio dessas hortaliças, em especial, os tomates que são fonte deste estudo.

Segundo Almeida-Filho (2008), a presença de protozoários ciliados nas hortaliças é indicativa de contaminação fecal de origem humana, e ou, animal, decorrente da água utilizada para a irrigação ou do manejo impróprio no cultivo e venda dessas hortaliças, especificamente nas feiras livres do país. Além disso, a presença desses organismos em hortaliças sugere um alto risco de infecção uma vez que eles coexistem com outras estruturas parasitárias para o homem.

A falta de infraestrutura adequada e ausência de saneamento básico nas feiras livres atrelado a ausência de água potável e práticas de higienização na manipulação humana aumentam o risco de contaminação humana. Silva et al (2010), relata a viabilidade e a quantidade de cistos e ovos de parasitos e/ou comensais intestinais, que podem ser eliminados no meio e veiculados pelas mãos, são as principais preocupações em relação à transmissão.

As divergências relacionadas às contaminações de tomates em comparação às outras olerícolas estão provavelmente relacionadas às características anatômicas da fruta, aos locais de estudo. Segundo Bento et al (2012), o controle parasitário é mais efetivo quando o produtor e/ou vendedor conta com certa infraestrutura, melhorando as condições de saneamento básico e, consequentemente, a higienização das hortaliças cultivadas e vendidas.

> [...] ações diretas como educação sanitária, diagnóstico parasitológico periódico e tecnologia sustentável na produção de olerícolas possibilitaria melhoria das condições higiênico-sanitárias de produção e manipulação de alimentos (BENTO et al, 2012, p. 68).

Os resultados alcançados neste estudo revelam que os agricultores e vendedores estão agindo corretamente no cultivo e manejo dos tomates, apesar de ser possível encontrar déficits na infraestrutura e saneamento básico nas feiras livres do município. Entretanto, mais estudos com este mesmo objetivo devem ser realizados, não somente com tomates, mas, envolvendo outras olerícolas, para assim ser alcançado, de fato, resultados concretos.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados evidenciou-se que os tomates cultivados e vendidos em algumas feiras livres do município de Santarém não apresentarem contaminação por nenhuma estrutura parasitária. Entretanto, mais pesquisas envolvendo outros tipos de olerícolas cultivadas e vendidas nas feiras livres devem ser realizados.

A avaliação da presença de estruturas parasitárias com potencial infectante em olerícolas é de suma importância para a saúde pública, visto que esta situação atinge diretamente a população. Cabe ao poder público fomentar a implantação de programas educativos voltados para a população, enfatizando a importância da higienização adequada das hortaliças antes do seu consumo e orientação aos agricultores e vendedores finais promovendo uma melhoria na qualidade da produção, especialmente quanto à irrigação, adubação e manejo destes, diminuindo assim o grau de contaminação desses alimentos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA FILHO, P.C. Avaliação das condições ambientais e higiênico-sanitárias na produção de hortaliças folhosas no núcleo hortícola suburbano de Vargem Bonita, Distrito Federal. **Dissertação** (Mestrado em Planejamento e Gestão Ambiental). Universidade Católica de Brasília, Brasília. 103 p., 2008.

ARBOS, K. A.; et al. Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, v.30, n.1, p.215-220, 2010.

AYERS, L. T.; et al. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 2006**. Morbidity and Mortality Weekly Report,** Atlanta, v.58, n.22, p. 609-615, 2009.

BENTO, R. R. L.; et al. Análises parasitológicas de olerícolas produzidas no Norte de Minas Gerais. **UNIMONTES CIENTÍFICA**, 2012.

CANTOS, G.A. et al. Estruturas parasitárias encontradas em hortaliças comercializadas em Florianópolis. **Revista News Lab**, v.66, p.154-63, 2004.

COELHO, E. M.; ROSA, O. O.; LIMA, M. G. Avaliação da qualidade microbiológica de alface (Lactuca sativa L.) em plantio direto e hidropônico. **Rev. Hig. Aliment**, v.21, n.149, p.94-98, 2007.

DIAS, B. C. O; GAZZINELLI, S. E. P. Verificação e identificação de formas parasitárias em culturas de alface (Lactuca sativa) na Estância Turística de São Roque. **Rev. eletrônica acadêmica.** IFSP – Campus São Roque, v.1, n.3, 2014.

MONTANHER, C. C.; CORADIN, D. C.; SILVA, S. E. F. Avaliação parasitológica em alfaces (**Lactuca sativa)** comercializados em restaurantes self-service por quilo, da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia,** v.29, n.66, p.63-71, 2007.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**. 11. Ed. São Paulo: editora Atheneu, 2005.

RESENDE, N. M. S. R. A.; PESSOA, R. S.; FRANÇA-BOTELHO, A. C. Interferências sazonais na contaminação parasitológica de alfaces em Araxá (MG), Brasil. **Rev. Saúde e Pesquisa**, v.7, n.3, p.389-394, 2014.

ROCHA, A.; MENDES, R. A.; BARBOSA, C. S. Strongyloides spp e outros parasitos encontrados em alfaces (**Lactuca sativa**). **Rev. de Patologia Tropical**, v.37, n.2, p.151-160, 2008.

SILVA, L. P. et al. Diagnóstico parasitológico de horticultures no monitoramento da contaminação parasitária em ambientes rurais. **Bioscience Journal**, v.26, n.4, p.648-652, 2010.

SOARES, B.; CANTOS, G.A. Qualidade parasitológica e condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Rev**. Brasileira de Epidemiologia, v.8, n.4, p.377-384, 2005.

TURBINO, R. A. Perfil endoparasitário de estudantes do ensino fundamental de escola pública em Ceilândia-DF: relações com o consumo de hortaliças e pescado. **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**. v.17, n.5, p.99-107, 2013.

CAPÍTULO 14

PROFILE OF CONTACT LENS WEARERS AND ASSOCIATED RISK FACTORS FOR ACANTHAMOEBA SPP

Data de aceite: 19/01/2021
Data de submissão: 14/12/2020

Denise Leal dos Santos
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Setor de Parasitologia
Porto Alegre, Rio Grande do Sul
ORCID: 0000-0001-5761-1302

Veridiana Gomes Virginio
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Setor de Parasitologia
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
ORCID: 0000-0003-1530-7841

Sergio Kwitko
Hospital de Clínicas de Porto Alegre Rio Grande do Sul, Departamento da Córnea, Serviço de Oftalmologia
Porto Alegre, Rio Grande do Sul
ORCID: 0000-0002-0604-2776

Diane Ruschel Marinho
Hospital de Clínicas de Porto Alegre Rio Grande do Sul, Departamento da Córnea, Serviço de Oftalmologia
Porto Alegre, Rio Grande do Sul
ORCID: 0000-0002-0050-5039

Bruno Schneider de Araújo
Hospital de Clínicas de Porto Alegre Rio Grande do Sul, Departamento da Córnea, Serviço de Oftalmologia
Porto Alegre, Rio Grande do Sul
ORCID: 0000-0001-5876-4204

Claudete Inês Locatelli
Hospital de Clínicas de Porto Alegre Rio Grande do Sul, Departamento da Córnea, Serviço de Oftalmologia
Porto Alegre, Rio Grande do Sul
ORCID: 0000-0002-8793-8194

Marilise Brittes Rott
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Setor de Parasitologia
Porto Alegre, Rio Grande do Sul
ORCID: 0000-0002-5227-4594

ABSTRACT: The aim of this study was to assess the risk factors for contracting *Acanthamoeba* keratitis by relating them to habits of contact lens wearers. In this study, 196 contact lens wearers from private clinics and a public hospital in Porto Alegre, Brazil, were interviewed between May 2015 and October 2016 for information about the type of contact lenses and cleaning solutions they used in order to evaluate the risks of developing *Acanthamoeba* keratitis. Most respondents (73.0%) were unaware of the existence of these amoebae, and almost half of the respondents (48.9%) reported wearing contact lenses while swimming in the sea or swimming pools, which increases the risks of contracting keratitis. Soft contact lenses, which were used by 49.0% of respondents, are more associated with *Acanthamoeba* keratitis than other types of lenses. Most of the lenses (78.5%) were purchased at ophthalmic clinics. A total of 66.8% of the respondents used a multipurpose solution

for cleaning, while 66.2% used rubbed their lenses during cleaning, both of which decrease the risk of contracting *Acanthamoeba* keratitis. Many respondents (42.6%) cleaned their contact lenses cases, and 40.8% replaced their cases annually. The majority of respondents were women (59.2%) with higher education (46.4%). It is extremely important for contact lens wearers to be aware of the risks involved in improper cleaning and maintenance of their lenses to avoid serious eye infections such as *Acanthamoeba* keratitis.
KEYWORDS: Contact lenses, *Acanthamoeba*, keratitis, profile, risk factors.

PERFIL DE USUÁRIOS DE LENTES DE CONTATO E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À ACANTHAMOEBA SPP

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar os fatores de risco de contrair ceratite por *Acanthamoeba* relacionando-os aos hábitos dos usuários de lentes de contato. Neste trabalho, 196 usuários de lentes de contato de clínicas privadas e um hospital público de Porto Alegre, no Brasil, foram entrevistados entre maio de 2015 e outubro de 2016 para obter informações sobre o tipo de lentes e soluções de limpeza que usavam avaliando assim os riscos de desenvolver ceratite por *Acanthamoeba*. A maioria dos entrevistados (73,0%) desconhecia a existência dessas amebas e quase metade desses (48,9%) relatou usar lentes de contato ao nadar no mar ou piscina, o que aumenta os riscos de contrair ceratite. As lentes de contato gelatinosas, usadas por 49,0% dos entrevistados, estão mais associadas à ceratite por *Acanthamoeba* do que outros tipos de lentes. A maioria das lentes (78,5%) foi adquirida em clínicas oftalmológicas. Um total de 66,8% dos pacientes usou solução multiuso para limpeza, enquanto 66,2% realizaram fricção digital nas lentes durante a limpeza, diminuindo assim o risco de contrair ceratite por *Acanthamoeba*. Muitos usuários (42,6%) limpavam seus estojos de lentes de contato e 40,8% os substituíram anualmente. A maioria dos entrevistados eram mulheres (59,2%) com ensino superior (46,4%). É extremamente importante que os usuários de lentes de contato estejam cientes dos riscos envolvidos na limpeza e manutenção inadequadas de suas lentes para evitar infecções graves nos olhos, como a ceratite por *Acanthamoeba*.
PALAVRAS-CHAVE: Lentes de contato, *Acanthamoeba*, ceratite, perfil, fatores de risco.

1 I INTRODUCTION

Contact lenses (CL) are a popular, convenient and effective method of correcting refractive errors (myopia, hyperopia and astigmatism) (BOOST et al., 2017). Globally, the CL market is very lucrative and a variety of lens types are available. Rigid gas-permeable (RGP) lenses are made of a combination of fluoropolymers and silicone acrylate, whereas the soft lenses are made of hydrogels, which are flexible polymers and with a high-water-content (MUSGRAVE & FANG, 2019).

In addition to aesthetics, comfort is a fundamental factor for CL, hence the preference for soft lenses (PRITCHARD et al., 1999). However, due to keratoconus, a corneal ectasia, only RGP lenses can achieve satisfactory visual correction for many users (LEÇA et al., 1995; SCHIRMBECK et al., 2005).

It is estimated that there are approximately 140 million CL wearers worldwide (TABUSHI et al., 2016). According to the Sociedade Brasileira de Lentes de Contato, there are at least 2 million CL users in Brazil (RIBEIRO, 2017).

Increased CL use is associated with the development of ocular diseases. Incorrect use of CL can lead to poor adaptation and contamination. Environmental factors may increase the number of corneal infections through of the proliferation of microorganisms such as protozoa, bacteria, fungi, and viruses (ROBERTSON et al., 2007).

A protozoan of the genus *Acanthamoeba* is the etiologic agent of amoebic keratitis (AK), an eye infection whose symptoms include pain, abnormal biomicroscopic findings, photophobia and vision loss (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; LORENZO-MORALES et al., 2006). There are two distinct life forms in the biological cycle of this protozoan: the trophozoite, its vegetative form, and the cyst, its resistance form. Infection occurs when trophozoites contact a previously damaged cornea, which can occur through the use of CL. Trophozoites adhere to surface receptors in corneal epithelial cells through mannose-protein binding. Thereafter, an infection cascade occurs that involves deeper stromal invasion, degradation of extracellular matrix components and induction of cell death in the host (PANJWANI, 2010; SANT'ANA et al., 2015; CARRIJO-CARVALHO et al., 2017).

Acanthamoeba spp. can be found in a wide range of environments, such as air, soil, water (CAUMO et al., 2009; SIDDIQUI & KHAN, 2012). CL and/or cases also may contain *Acanthamoeba* spp. However, RGP lenses are less associated with this microorganism than soft lenses (ANJOS et al., 2013; PAGE & MATHERS, 2013). Our group retrospectively reviewed 28 cases of AK in Porto Alegre (southern Brazil), all of whom wear CL, in addition to identifying possible risk factors and clinical outcomes. The main reported risk factors for AK in CL users include biofilm formation through poor hygiene of CL and cases, lens deposits through a lack of rubbing while cleaning, corneal damage during CL placement and exposure to water (DEJACO-RUHSWURM et al., 2001; WU et al., 2010; ZHU et al., 2011; SANTOS et al., 2018; PADZIK et al., 2019). Tap water may contain pathogenic *Acanthamoeba* spp. and it is not recommended for rinsing CL (STAPLETON et al., 1991; WALOCHNIK et al., 2015). Multipurpose solutions consisting of polyhexamethylene biguanide or polyquad (polyquaternium-1) are recommended for cleaning, rinsing, disinfecting and storing CL (ROSENTHAL et al., 1999; WU et al., 2010). However these solutions are not completely effective against *Acanthamoeba* spp., especially in their dormant cyst stage (MOON et al., 2016).

AK is frequently misdiagnosed as herpes, which could delay treatment (KHAN, 2006) Many clinical signs look like other types of keratitis, so it is important to suspect AK if the patient is a CL wearer (SZENTMARY et al., 2019).

The objective of this study was to determine the profile of CL wearers in a large city and assess their CL care and maintenance habits to decrease the risk of contracting AK. An issue for concern is that majority of the respondents (73.0%) were unaware of the existence

of an amoeba that causes AK in CL wearers through misuse and poor maintenance.

2 I MATERIAL AND METHODS

This study was conducted in the southern Brazilian city of Porto Alegre, capital of the state of Rio Grande do Sul, between May 2015 and October 2016. A 23-item questionnaire was designed to elicit responses about the handling, use, cleaning, and maintenance of CL and cases. The questionnaire was applied to 196 CL users when they came in for a medical appointment. The sample size was calculated based on the following: 85 to 88% of people who contracted *Acanthamoeba* keratitis in the United States and the United Kingdom whose prevalence is 5%, were contact lenses wearers (DART et al., 2009). These foreign data have been used since they are not available in Brazil.

The interviews were conducted with 112 CL wearers from the ophthalmology service of a public hospital and 84 CL wearers from three private ophthalmology clinics. Patients aged 14 to 80 years were eligible for the study, and those under 18 years of age were only allowed to participate with parental authorization.

The study involved no potential risk and adhered to Declaration of Helsinki guidelines for research involving human subjects. It was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Ethics Committee (registration number: 1.405.611/approval number: CAEE 47915215.2.0000.5327). Participants who took part in the survey provided written informed consent prior to inclusion and questionnaire administration. After the purpose of the study was explained, the participants' anonymity and confidentiality were assured, as well as their right to ask questions.

3 I RESULTS

3.1 Contact lens wearer habits and knowledge of *Acanthamoeba* spp. Infection

A total of 73.0% of the participants were unaware of the existence of an amoeba that caused AK due to inadequate CL maintenance and cleaning. Ninety-two (48.9%) respondents reported wearing their CL while swimming in the sea or a swimming pool, while 96 (51.1%) reported that they do not.

3.2 Contact lens and case maintenance

The data on CL and case cleaning habits and use of disinfection solutions are shown in Table 1. Most of the CL users (66.8%) washed their lenses with multipurpose solutions. Most interviewees (66.2%) rubbed their lenses during cleaning, cleaned their CL cases weekly (42.6%) and replaced them annually (40.8%).

Contact lens and case maintenance	**Total sample N (%)**
Cleaning products	
Multipurpose solution	131 (66.8)
Water	2 (1.0)
Saline solution	7 (3.6)
Liquid soap and water	3 (1.5)
More than one product	53 (27.1)
Cleaning method	
Rinsing with cleaning solution	
Rubbing	66 (33.8)
	129 (66.2)
Case cleaning	
Daily	73 (37.4)
Weekly	83 (42.6)
Monthly	19 (9.7)
Rarely	16 (8.2)
Never	4 (2.1)
Case replacement	
Monthly	30 (15.3)
Quarterly	38 (19.4)
Half-yearly	45 (23.0)
Yearly	80 (40.8)
Never	3 (1.5)

Note: The number of individuals with missing values was 1 for case cleaning

Table 1: Contact lens and case maintenance reported by interviewees between May 2015 and October 2016 (N=196).

3.3 General characteristics of the interviewed contact lens wearers

The participants were generally young and female, with some higher education (Table 2). The sample included 116 females (59.2%) and 80 males (40.8%). The majority of the interviewees (29.1%) were between 20 and 29 years of age. A total of 91 (46.4%) participants had some higher education.

Age in years	Male (%)	Female (%)	Total (%)
14-19	7 (3.6)	10 (5.1)	17 (8.7)
20-29	27 (13.8)	30 (15.3)	57 (29.1)
30-39	24 (12.2)	29 (14.8)	53 (27.0)
40-49	10 (5.1)	18 (9.2)	28 (14.3)
50-59	8 (4.1)	24 (12.2)	32 (16.3)
60-69	3 (1.5)	5 (2.6)	8 (4.1)
>70	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
Education level			
Elementary/ middle school	10 (5.1)	19 (9.7)	29 (14.8)
High school	36 (18.4)	40 (20.4)	76 (38.8)
Higher education	33 (16.8)	58 (29.6)	91 (46.4)

Table 2: General characteristics of contact lens wearers interviewed between May 2015 and October 2016 (N=196)

3.4 Types of lenses used by the participants

Of the 112 public hospital patients, 68 (60.7%) used RGP lenses, while of the 84 private clinic patients, 66 (78.6%) reported using soft CL (Table 3).

Type of CL	Public hospital patients N=112	Private clinic patients N=84
RGP	68 (60.7%)	15 (17.8%)
Soft lenses	30 (26.8%)	66 (78.6%)
Other type	14 (12.5%)	3 (3.6%)

Table 3: Types of lenses worn by the participants

3.5 Contact lens type and purpose

Table 4 shows participant responses for why they used CL, the type of lenses they use, and where they purchased them. Of the 196 respondents, 95 (48.7%) reported purchasing their CL after referral from their ophthalmologist, and 96 (49.0%) reported using soft CL. Most of patients (153; 78.5%) purchased their CL at their ophthalmologist's clinic.

Response	Total sample N (%)
Why did you decide to use contact lenses?	
Glasses bother me	64 (32.8)
Suggestion of friends	4 (2.1)
Medical indication	95 (48.7)
Media	0 (0.0)
Other	22 (11.3)
More than one answer	10 (5.1)
What type of contact lens do you use?	
RGP	83 (42.3)
Soft	96 (49.0)
Scleral	2 (1.1)
Piggyback (soft + RGP)	13 (6.6)
RGP/scleral	1 (0.5)
Unknown	1 (0.5)
Where did you buy your contact lenses?	
Ophthalmic clinic	153 (78.5)
Optical shop	38 (19.5)
Internet	1 (0.5)
More than one place	3 (1.5)

Note: One respondent selected two answers for the question: Why have you decided to wear contact lenses? One respondent did not answer the question “Why did you decide to wear contact lenses?” and another did not answer the question “Where did you buy your contact lenses?

RGP= rigid gas permeable.

Table 4: Motivation, type and purchase location reported by contact lens wearers interviewed between May 2015 and October 2016 (N=196).

4 I DISCUSSION

Due to the growing number of CL users in Brazil, is extremely important to understand their profile and educate them about the importance of good hygiene and maintenance of their lenses and cases to avoid the eye infections such as AK. A previous study conducted by our group in Porto Alegre showed that CL wearers who developed AK did not consider certain essential precautions, such as not swimming while wearing the lenses (SANTOS et

al., 2018).

Although most of the participants in the present study reported that they do not wear their CL while swimming in the sea or swimming pools, many did. *Acanthamoeba* spp. have been detected in swimming pools and spas, which confirms that these protozoans have a wide distribution in the environment and underscores the importance of not wearing CL in aquatic environments (CAUMO et al., 2009; FABRES et al., 2016; STAGGEMEIR et al., 2016; FABRES et al., 2018).

Multipurpose solutions were the most commonly used cleaning solutions, followed by water, saline, and liquid soap. Although no current cleaning solution is effective against *Acanthamoeba* spp., using multipurpose solutions is a positive factor, since they help disinfect the CL and extend their useful life. Multipurpose solutions help remove protein deposits and have lubricating properties that simplify the cleaning process (LUI et al., 2009). However, multipurpose solutions alone are not enough to ensure proper CL maintenance.

Many CL wearers do not properly clean or replace their CL cases. By not doing so, a stagnant environment is created that provides ideal conditions for biofilm formation, which facilitates microorganism adhesion (PENS et al., 2008; SWEENEY et al., 2009; BELJAN et al., 2013), including *Acanthamoeba* spp., a parasite unknown to most of the interviewees.

Since AK is considered a rare (JOSLIN et al., 2007) and poorly known disease (PATEL et al., 2010), it is essential that CL wearers be provided with more information in order to prevent it. Late diagnosis of AK is difficult to treat, often leading to corneal transplant (ALVES et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

Most respondents reported rubbing their CL to clean them. Rubbing is an extremely important step that is often overlooked by CL wearers since, when combined with a multipurpose solution, it removes the biofilm that can adhere to CL, thus preventing AK (LIPENER & RAY, 2008).

Most of the interviewees reported purchasing their CL directly from their ophthalmologists; only a few purchased them from optical shops, over the Internet, or in more than one of these places. This is probably because patients rely strongly on their care practitioners to choose the best lenses for them.

It is important that ophthalmologists provide patients with evidence-based advice during medical appointments to prevent eye problems such as AK, which could lead to vision loss and corneal transplant. Since the Brazilian medical system's capacity for corneal transplantation cannot keep up with the growing demand, it is necessary to implement more effective public policies to adequately meet this demand and reduce time on corneal transplant waiting lists (ALMEIDA et al., 2018).

Care practitioners reduce risk factors associated with CL through careful screening of potential users, guiding patients about proper hygiene and maintenance (VIDOTTI et al., 2006; BELJAN et al., 2013) and educating patients about alternative ways to correct their vision.

Many of the participants used soft lenses. Currently, several types of CL are made of third-generation materials and provide better vision and greater comfort to those who wear them. Soft lenses are clearly preferable due to their softness, oxygen permeability, comfort and good tolerability by most users (OCANSEY et al., 2019). However, despite the fact that all types of CL have been associated with AK, the greatest risk is associated with prolonged daily use of soft CL rather than RGP lenses (ALVARENGA et al., 2000).

Most respondents from the public hospital used RGP lenses due to their type of visual impairment. RGP lenses are used primarily for certain eye diseases, such as keratoconus or high astigmatism, since it is one of the few options for achieving good visual acuity.

The majority of respondents in this study were young and female. This could be related to the fact that women are more concerned about their appearance, and CL have both optical and aesthetic advantages (e.g. colored lenses), as well as occupational, sports and cosmetic advantages (CUKIERMAN & BOLDRIM, 2004). Another relevant finding was the educational level of the interviewees, most of whom had some higher education, which may be attributed to their age and socioeconomic class (OCANSEY et al., 2019).

Nevertheless, a considerable portion of the participants reported that they do not follow medical instructions and are unaware of diseases that can affect them as a result of poor CL hygiene and maintenance. Compliance with instructions about the proper care and maintenance of CL and cases is a priority to avoid sight-threatening diseases.

5 | CONCLUSION

The results of this questionnaire underscored the fact that constant vigilance is required to properly maintain lenses and storage cases to avoid keratitis caused by *Acanthamoeba* spp. and other eye diseases. Many patients do not follow medical guidelines, unaware that poor hygiene habits can affect them. It is very important that these patients receive proper orientation while adapting to CL to avoid health problems, such as AK, which can lead to vision loss and the need for corneal transplantation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the staff of the Department of Microbiology, Immunology and Parasitology of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul and the Ophthalmology Department of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) for their assistance

Funding: This study received financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA).

REFERENCES

ALVES, D.S.M.M. *et al*. The first *Acanthamoeba* keratitis case in the midwest region of Brazil: diagnosis, genotyping of the parasite and disease outcome. Case Report. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 51, n. 5, p. 716-719, sep./oct. 2018.

ALMEIDA, H.G. *et al*. A 15-year review of corneal transplant in Brazil. **Eye Contact Lens**, v. 44, n. 2, p. 376-38, nov. 2018.

ALVARENGA, L.S.; FREITAS, D.; HOFLING-LIMA, A.L. Ceratite por *Acanthamoeba*. **Arq Bras Oftalmol**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 155-159, mar./abr. 2000.

ANJOS, R. *et al*. Queratite por acantamoeba – revisão de 6 casos clínicos. **Oftalmologia**, v. 37, n. 4, p. 283-290, out./nov. 2013.

BELJAN, J.; BELJAN, K.; BELJAN, Z. Complications caused by contact lens wearing. **Coll Antropol**, v. 37, n. 1, p. 179-187, apr. 2013.

BOOST, M.; CHO, P.; WANG, Z. Disturbing the balance: effect of contact lens use on the ocular proteome and microbiome. **Clin Exp Optom**, v. 100, n. 5, p. 459-472, sep. 2017.

CARRIJO-CARVALHO, L. *et al*. Therapeutic agents and biocides for ocular infections by free-living amoebae of *Acanthamoeba* genus. **Surv Ophthalmol**, v. 62, n. 2, p. 203-218, mar./apr. 2017.

CAUMO, K. *et al*. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 103, n. 6, p. 477-485, sep. 2009.

CUKIERMAN, E.; BOLDRIM, T. Profile of contact lens sector of the Santa Casa de Misericordia of Rio de Janeiro. **Rev Bras Oftalmol**, v. 64, n. 2, p. 77-82, dec. 2004.

DART, J.K.G.; SAW, V.P.J.; KILVINGTON, S. *Acanthamoeba* Keratitis: diagnosis and treatment update 2009. **Am J Ophthalmol**, v. 148, n. 4, p. 487-497, oct. 2009.

DEJACO-RUHSWURM, I. *et al*. Contact lens induced keratitis associated with contact lens wear. **Acta Ophthalmol Scand**, v. 79, n.5, p. 479-483, oct. 2001.

FABRES, L.F. *et al*. Isolation and identification of *Acanthamoeba* spp. from thermal swimming pools and spas in southern Brazil. **Acta Parasitol**, v. 61, n. 2, p. 221-227, may. 2016.

FABRES, L.F. *et al*. Virulent T4 *Acanthamoeba* causing keratitis in a patient after swimming while wearing contact lenses in southern Brazil. **Acta Parasitol**, v. 63, n. 2, p. 428-432, jun. 2018.

JOSLIN, C.E. *et al*. The association of contact lens solution use and *Acanthamoeba* keratitis. **Am J Ophthalmol**, v.144, n. 2, p. 169-180, aug. 2007.

KHAN, N.A. *Acanthamoeba:* biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiol Rev**, v. 30, n. 4, p. 564-595, jul. 2006.

LEÇA, R.G. *et al*. Estudo clínico da adaptação de lentes de contato no ceratocone. **Arq Bras Oftalmol**, v. 58, n. 3, p. 149-51, jun. 1995.

LIPENER, C.; RAY, C.B.M. Sistemas atuais de cuidados e manutenção de lentes de contato**. Arq Bras Oftalmol**, v. 71, n. 6, p. 9-13, 2008.

LORENZO-MORALES, J. *et al*. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. **Acta Trop**, v. 100, n. 1-2, p. 63-69, oct. 2006.

LUI, A.C.F. *et al*. Avaliação da ação antimicrobiana de soluções multiuso para desinfecção de lentes de contato hidrofílicas, in vitro. **Arq Bras Oftalmol**, São Paulo, v. 72, n. 5, p. 626-630, sep./oct. 2009.

MOON, E.K. *et al*. Efficacy of Korean multipurpose contact lens disinfecting solutions against *Acanthamoeba castellanii*. **Korean J Parasitol**, v. 54, n. 6, p. 697-702, dec. 2016.

MUSGRAVE, C.S.A.; FANG, F. Contact lens materials: a materials science perspective. **Materials (Basel)**, v.12, n. 26, p. 1-35, jan. 2019;

OCANSEY, S. *et al*. Profile, knowledge, and attitude of contact lens users regarding contact lens wear in Ghana**. Cont Lens Anterior Eye**, v. 42, n. 2, p. 170-177, apr. 2019.

PADZIK, M. *et al*. Evaluation of in vitro effect of selected contact lens solutions conjugated with nanoparticles in terms of preventive approach to public health risk generated by *Acanthamoeba* strains. **Ann Agric Environ Med**, v. 26, n. 1, p. 198-202, mar. 2019.

PAGE, M.A.; MATHERS, W.D. *Acanthamoeba* Keratitis: A 12-year experience covering a wide spectrum of presentations, diagnoses, and outcomes. **J Ophthalmol**, p. 1-6, may. 2013.

PANJWANI, N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. **Ocul Surf**, v.8, n. 2, p. 70-79, apr. 2010.

PATEL, D.V.; RAYNER, S.; MCGHEE, C.N. Resurgence of *Acanthamoeba* keratitis in Auckland, New Zealand: a 7-year review of presentation and outcomes. **Clin Exp Ophthalmol**, v. 38, n. 1, p. 15-20, apr. 2010.

PENS, C.J. *et al*. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. **Parasitol Res**, v. 103, n. 6, p. 1241-1245, oct. 2008.

PRITCHARD, N.; FONN, D.; BRAZEAU, D. Discontinuation of contact lens wear: a survey. **Int Contact Lens Clin**, v. 26, n. 6, p. 157-162, nov. 1999.

RIBEIRO, M.C.M.P. **Impacto de lentes de contato gelatinosas na superfície ocular**. 2017. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2017.

ROBERTSON, D.M. *et al*. The role of contact lens type, oxygen transmission, and care-related solutions in mediating epithelial homeostasis and *Pseudomonas* binding to corneal cells: an overview. **Eye Contact Lens**, v. 33, n. 6, p. 394-398, nov. 2007.

ROSENTHAL, R.A.; BELL, W.M.; ABSHIRE, R. Disinfecting action of a new multipurpose disinfection solution for contact lenses. **Cont Lens Anterior Eye**, v. 22, n. 4, p. 104-109, nov. 1999.

SANT'ANA, V.P. *et al*. Cytotoxic activity and degradation patterns of structural proteins by corneal isolates of *Acanthamoeba* spp. **Graef Arch Clin Exp**, v. 253, n. 1, p. 65-75, aug. 2015.

SANTOS, D.L. *et al*. *Acanthamoeba* keratitis in Porto Alegre (southern Brazil): 28 cases and risk factors. **Parasitol Res**, v. 117, n. 3, p. 747-750, mar. 2018.

SCHIRMBECK, T. *et al*. Eficácia e baixo custo no tratamento do ceratocone com o uso de lentes de contato rígidas gás-permeáveis. **Arq Bras Oftalmol**, v. 68, n. 2, p. 219-222. 2005.

SCHUSTER, F.L.; VISVESVARA, G.S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 9, p. 1001-1027, aug. 2004.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N.A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasit Vectors**, v. 5, n. 6, p. 1-13, jan. 2012.

STAPLETON, F.; SEAL. D.V.; DART, J. Possible environmental sources of *Acanthamoeba* species that cause keratitis in contact lens wearers. **Rev Infect Dis**, v. 13, n. 5(S392), mar./apr. 1991.

STAGGEMEIER, R. *et al*. Detection and quantification of human adenovirus genomes in *Acanthamoeba* isolated from swimming pools. **An Acad Bras Cienc**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 1, p. 635-641, 2016.

SWEENEY, D. *et al*. Best practice contact lens care: a review of the Asia Pacific contact lens care summit. **Clin Exp Optom**, v. 92, n. 2, p. 78-89, mar. 2009.

SZENTMARY, N. *et al*. *Acanthamoeba* keratitis e clinical signs, differential diagnosis and treatment. **J Curr Ophthalmol**, v. 31, n. 1p. 16-23, mar. 2019.

TABUSHI, F.L. *et al*. Demographic and behavioral profile of patients with optic medical indication of contact lenses. **Rev Bras Oftalmol**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 4, p. 264-268, jul-aug, 2016.

VIDOTTI, V.G.; KAMEGASAWA, A. Profile of medical students from the Universidade Estadual Paulista - UNESP - Botucatu, who wear contact lenses. **Arq Bras Oftalmol**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 197-201, mar./abr. 2006.

WALOCHNIK, J.; SCHEIKLA, U.; HALLER-SCHOBERB, E.V. Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. **J Eukaryot Microbiol**, v. 62, n. 1, p. 3-11, jan. 2015.

WU, Y.T. *et al*. Removal of biofilm from contact lens storage cases. Invest **Ophthalmol Vis Sci**, v. 51, n. 12, p. 6329-33, dec. 2010.

ZHU, H. *et al*. Importance of rub and rinse in use of multipurpose contact lens solution. **Optom Vis Sci**, v. 88, n. 8, p. 967-972, aug. 2011.

CAPÍTULO 15

MAYARO: UMA AMEAÇA PARA O BRASIL

Data de aceite: 19/01/2021
Data de submissão: 05/01/2020

Patrick Jesus de Souza
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Laboratório de Imunologia Viral
Lattes: http://lattes.cnpq.br/0992472624479951

Suellen da Costa Fonseca
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Laboratório de Imunologia Viral
Instituto de Tecnologia em Fármacos- ITF-Farmanguinhos - FIOCRUZ
Lattes: http://lattes.cnpq.br/1966078796027901

RESUMO: O Mayaro é um arbovírus, com RNA fita única de polaridade positiva, pertencente à família *Togaviridae* e ao genêro *Alfavírus*. Circulante no continente americano desde a década de 1950, o Mayaro apresenta-se através surtos em áreas rurais, ocasionados por variantes pertencentes aos genótipos D, L, N e pelo recombinante D/L. Mantido na natureza por ciclos enzoóticos, acredita-se que o Mayaro tenha como principais atores, primatas não-humanos e mosquitos acrodendrofílicos dos gêneros *Haemagogous* e *Sabethes.* Clinicamente, a infecção por Mayaro é caracterizada por quadros febris, acrescidos de artralgia com possível progressão para a fase crônica. No Brasil, o Mayaro circula desde a década de 1950, e vem ocasionando inúmeros surtos ao longo dos últimos anos. Embora ocorra na Amazônia e Cerrado, o Mayaro é uma arbovirose negligenciada no Brasil. No entanto, esta arbovirose ameaça cada vez mais o país, especialmente devido ao seu impacto para saúde humana, sua dinâmica epidemiológica e deficiências encontradas para o seu diagnóstico, prevenção e controle. Desta forma, este trabalho descreve as principais características do Mayaro, e aponta a necessidade de um olhar integral, como a do tipo *One Health*, para um melhor manejo desta ameaça no país.

PALAVRAS-CHAVE: Mayaro; Alfavírus; Epidemiologia; Arboviroses;

MAYARO: A THREAT TO BRASIL

ABSTRACT: Mayaro is an arbovirus, with single-stranded RNA with positive polarity, belonging to the *Togaviridae* family and to the genus *Alfavirus*. Mayaro virus circulates in the American continent since the 1950s, and causes outbreaks in rural areas, by variants belonging to the genotypes D, L, N and by the recombinant D / L. Supported in nature by enzootic cycles, it is believed that Mayaro has the main actors, non-human primates and acrodendrophilic mosquitoes of the genus *Haemagogous* and *Sabethes.* Clinically, a Mayaro infection is characterized by febrile conditions, associated to arthralgia with possible progression to the chronic phase. In Brazil, Mayaro has been occurs since the 1950s, and has been causing many outbreaks over the past few years. Although it occurs in the Amazon and the Cerrado, Mayaro is a neglected arbovirus in Brazil. However, this arbovirus is increasingly threatening the country, especially due to its impact on human health, its epidemiological dynamics and deficiencies found in its diagnosis, prevention and control. In this way, this work describes the main characteristics

of Mayaro, and highlight the need for a comprehensive look, such as the One Health vision, for a better management of this threat in the country.

KEYWORDS: Mayaro; Alphavirus, Epidemiology; Arboviruses;

CARACTERÍSTICAS VIRAIS

O vírus Mayaro (MAYV) é um arbovírus pertencente ao gênero *Alphavirus* e à família *Togaviridae*, e é tipicamente agrupado como um alfavírus do velho mundo. Assim como outros *Alfavírus,* o MAYV apresenta um RNA de fita simples e polaridade positiva. Este arbovírus possui um genoma de aproximadamente 11.5kb, que codifica 4 proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e cinco proteínas estruturais (C-E3-E2-6k-E1) (ESPOSITO, D. L. A.; DA FONSECA, B. A. L., 2017).
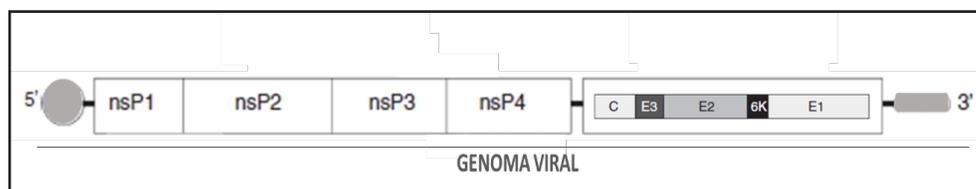
Figura 1: Genoma do MAYV. Genes que codificam as proteínas estruturais e não estruturais estão posicionados da esquerda para a direita, respectivamente. Adaptado de Esposito & Da Fonseca, 2017.

O gene codificante da proteína não estrutural 1 (nsP1), é uma região do genoma bem conservada entre os *Alfavírus*, e por esta razão tem sido alvo de estudos para o diagnóstico de alfaviroses, bem como a identificação de *Alfavírus* ainda desconhecidos (ROMEIRO, M. F. *et al*., 2016).

No que tange à diversidade genética do MAYV, acredita-se que este não possua variantes antigenicamente distintas, como ocorre no caso da dengue (DENV). No entanto, estudos filogenéticos identificaram a ocorrência de variantes de MAYV com certa homologia entre si, e estes foram agrupados nos genótipos D, L, N e no recombinante D/L (AUGUSTE, A. J. *et al.,* 2015; MAVIAN, C. *et al*., 2017; revisto por LORENZ, C. *et al*., 2019).

CICLO ENZOÓTICO

Em decorrência de seu ciclo de transmissão vetorial, o Mayaro é considerado um arbovírus, ou seja, um agente viral transmitido por artrópodes. No caso do Mayaro, o ciclo transmissão possui caráter enzoótico, mantido na natureza por primatas não-humanos (PNH) e espécies de mosquitos acrodendrofílicos (figura 2), especialmente do gênero *Haemagogous* e *Sabethes* (MOTA, M. T. O. *et al*., 2015; MACKAY, I. M. & ARDEN, K. E. 2016; KUNO, G. *et al.,* 2017).

Figura 2: Ilustração de um ciclo enzoótico de Mayaro. *acredita-se que o MAYV também seja transmitido à prole de culicídeos infectados, através da via transovariana.

Evidências sorológicas de anticorpos anti-MAYV reforçam a manutenção do ciclo silvestre através de vertebrados como preguiças, marsupiais, roedores, quatis, artiodátilos, primatas não-humanos e aves (VASCONCELOS, P. F. C. *et al.,* 2001; DE THOISY, B. *et al.*, 2003). Neste sentido, Long e colaboradores (2011) demonstraram que a infectividade de *Aedes aegypti* por MAYV aumentava em até 5X, quando fêmeas de mosquitos alimentavam-se em roedores infectados por MAYV (LONG, K. C. *et al.*, 2011).

No Brasil, há relatos de ocorrência de MAYV em populações de *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Mansonia venezuelensis*, *Sabethini spp*. e *Psorophora spp*. Tendo em vista a capacidade de o MAYV infectar *Aedes*, este fato salienta a possibilidade de expansão deste arbovírus para áreas mais urbanas e populosas do país, em consideração ao comportamento do *Aedes aegypti* (LONG, K. C. *et al.,* 2011; SERRA, O. P. *et al.,* 2016). Dentre os anos de 2009-2010, Pauvolid-Corrêa relata evidências sorológicas de MAYV em Equídeos na região do Pantanal (PAUVOLID-CORRÊA, A. *et al.,* 2015).

ASPECTOS CLÍNICOS DE UMA INFECÇÃO POR MAYARO

Embora ainda se conheça pouco sobre o Mayaro, acredita-se que após ser inoculado no hospedeiro, o MAYV passa por um período de incubação que dura cerca de 03-11 dias, e provoca uma baixa viremia que geralmente cursa com quadros febris seguidos de mialgia, cefaleia, dor retro-orbitária, rash cutâneo, sangramentos, fotofobia, icterícia e artralgias (MOURÃO, M. P. G. *et al.,* 2012).

Embora também esteja presente na fase aguda da doença, a artralgia aliada à cronicidade dá ao MAYV o status de arbovírus artritogênico, assim como é para o Chikungunya (CHIKV). Por este motivo, indivíduos infectados por MAYV podem desenvolver poliartralgias de longa duração, resultantes de inflamações crônicas em articulações (LEVI, L. L. & VIGNUZZI, M., 2019).

Além dessas manifestações clínicas, casos de trombocitopenia e leucopenia também são reportadas para a infecção provocada pelo MAYV (MACKAY, I. M. & ARDEN, K. E. 2016).

HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

De acordo com os registros, relata-se que O MAYV tenha sido isolado primariamente em 1954 nas ilhas de Trinad e Tobago, através de amostras sanguíneas de 4 trabalhadores de áreas silvestres e uma moradora de zona urbana (ANDERSON, C. R. *et al.*, 1957). Desse período em diante, o MAYV tem circulado endemicamente nas Américas, vide Figura 3. (GANJIAN, N. & RIVIERE-CINNAMOND, A., 2020).

Como observado na figura abaixo, o Brasil se destaca como o país que mais reporta casos de MAYV nas Américas (figura 3), sendo responsável por mais da metade dos casos registrados (GANJIAN, N. & RIVIERE-CINNAMOND, A., 2020). Embora tenha sido isolado em 1957 no Pará, grande parte do que se sabe sobre a epidemiologia do Mayaro foi conhecida durante uma epidemia em 1978 na cidade paraense de Belterra, com cerca de 55 casos confirmados laboratorialmente (PINHEIRO, J. *et al.,* 1981).

Após este período, registros no Brasil de circulação do MAYV são reportados especialmente na região amazônica e do planalto central (VASCONCELOS, P. F. C. *et al.,* 2001, TAVARES-NETO, J. *et al.*, 2004, DA SILVA-NUNES, M. *et al.*, 2006, COIMBRA, T. L. M. *et al.,* 2007, FIGUEIREDO, L. T. M., 2007).

País	Nº total de casos
ARGENTINA	3
BOLIVIA	60
BRASIL	495
EQUADOR	6
GUIANA FRANCESA	1
HAITI	1
MEXICO	2
PANAMA	1
PERU	230
TRINIDAD E TOBAGO	5
VENEZUELA	81

Figura 3: Mapa do cumulativo de casos de MAYV no mundo, evidenciando circulação exclusiva nas Américas.

Embora a circulação de MAYV se dê majoritariamente em ambientes silvestres, Goiás, Pará, Tocantins, Roraima, Mato Grosso, Amazonas, Amapá, Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal registraram surtos da doença durante os anos de 2014 e 2016 (Brasil, 2016). Vieira e colaboradores (2015) detectaram o genoma de MAYV em pacientes com suspeita de dengue na cidade de Sinop/MT durante os anos de 2011 e 2012, evidenciando a circulação do genótipo L na região onde já havia sido detectada a circulação do genótipo D. Mais recentemente, Romeiro e colaboradores (2020) analisaram cerca de 5.608 bolsas de sangue de doadores da cidade de São Carlos/SP e reportaram a presença de anticorpos de anti-MAYV classe IgM e IgG, o que sugere a dispersão do vírus para áreas não endêmicas (ROMEIRO, M. F. *et al.*, 2020).

ALERTAS, DESAFIOS E DEMANDAS PARA O BRASIL

Através de um estudo de distribuição de casos de Mayaro na América do Sul, bem como a análise de variáveis socioambientais, Lorenz e colaboradores (2019) apontaram a região do Cerrado brasileiro como o bioma mais relacionado com casos de Mayaro na América do Sul. Além disso, os autores ainda relataram uma mudança no padrão de distribuição da dos casos, que ao longo dos últimos anos vem ocorrendo nas áreas mais urbanizadas, aumentando o risco de novos surtos (LORENZ, C. *et al.*, 2019).

Outro ponto importante e que merece atenção das autoridades de vigilância em saúde do país, é a dispersão do vírus da febre amarela (YFV) de regiões endêmicas para o leste do país (DELATORRE, E. *et al.*, 2019). A importância disso se dá em razão do compartilhamento de vetores e hospedeiros nos ciclos enzoóticos de YFV e MAYV, ou seja,

existe uma real possibilidade do então endêmico MAYV traçar a mesma rota de dispersão do YFV para a região mais populosa do país, e que inclusive é infestada por *Aedes aegypti*.

A GloPID-R, uma rede de organizações que financiam a pesquisa de doenças infecciosas, ressaltou a necessidade de: a) vigilância entomológica; b) de testes sorológicos que superem as reações cruzadas entre *Alfavírus* artritogênicos; c) o estabelecimento de critérios clínicos para definição de casos suspeitos e confirmados de Mayaro; d) testes moleculares multiplex para diagnóstico diferencial em áreas de co-circulação de alfavírus; e) estudo de infecções sequenciais por *Alfavírus*; f) determinar a existência de síndrome pós-MAYV; e g) critérios para classificação genotípica das cepas de Mayaro (PEZZI, L. *et al*., 2019).

CONCLUSÃO

Como observado no decorrer deste capítulo, o Mayaro constitui uma grande ameaça para o Brasil. Especialmente, por seu quadro clínico, que embora pouco conhecido, causa uma doença febril, artritogênica e com potencial de cronicidade dos casos; e pela sua dinâmica epidemiológica, que além de casos humanos, envolve uma dezena de animais hospedeiros e vetores. Atrelado a isto, bem como as possibilidades de surtos e dispersão, e deficiências apontadas, este trabalho salienta a necessidade de intensa vigilância, especialmente abordagens do tipo *One Health*, para prevenção e controle do MAYV no Brasil.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, C. R. *et al.* Mayaro Virus: A New Human Disease Agent. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1012–1016, 1 nov. 1957.

AUGUSTE, A. J. *et al.* Evolutionary and ecological characterization of mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1742–1750, 2015.

COIMBRA, T. L. M. *et al.* Mayaro virus: Imported cases of human infection in São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 49, n. 4, p. 221–224, 2007.

DELATORRE, E. *et al.* Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions from 2015 to 2018. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 1–12, 2019.

ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. DA. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 540–544, 2017.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–229, 2007.

GANJIAN, N.; RIVIERE-CINNAMOND, A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 44, p. 1–11, 2020.

KUNO, G. *et al.* Vertebrate reservoirs of arboviruses: Myth, synonym of amplifier, or reality? **Viruses**, v. 9, n. 7, p. 1–28, 2017.

LEVI, L. I.; VIGNUZZI, M. Arthritogenic alphaviruses: A worldwide emerging threat? **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 1–26, 2019.

LONG, K. C. *et al.* Experimental transmission of Mayaro virus by Aedes aegypti. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 4, p. 750–757, 2011.

LORENZ, C.; FREITAS RIBEIRO, A.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Mayaro virus distribution in South America. **Acta Tropica**, v. 198, n. July, p. 105093, 2019.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? **Microbes and Infection**, v. 18, n. 12, p. 724–734, 2016.

MAVIAN, C. *et al.* Emergence of recombinant Mayaro virus strains from the Amazon basin. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

MOTA, M. T. O. *et al.* Complete genome sequence of mayaro virus imported from the Amazon Basin to São Paulo State, Brazil. **Genome Announcements**, v. 3, n. 6, p. 4269, 2015.

PAUVOLID-CORRÊA, A. *et al.* Neutralising antibodies for mayaro virus in Pantanal, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 125–133, 2015.

PEREIRA SERRA, O. *et al.* Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 20–29, 2016.

PEZZI, L. *et al.* GloPID-R report on chikungunya, o'nyong-nyong and Mayaro virus, part 3: Epidemiological distribution of Mayaro virus. **Antiviral Research**, v. 172, n. September, 2019.

PINHEIRO, FRANCISCO P; FREITAS, RONALDO B; TRAVASSOS DA ROSA, JORGE F; GABBAY, YVONE B; MELLO, WYLLER A; LEDUC†, J. W. An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 3, p. 674–681, 1 maio 1981.

ROMEIRO, M. F. *et al.* A real-time RT-PCR for rapid detection and quantification of mosquito-borne alphaviruses. **Archives of Virology**, v. 161, n. 11, p. 3171–3177, 2016.

___. Serological evidence of Mayaro virus infection in blood donors from São Carlos, São Paulo, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 114, n. 9, p. 686–689, 2020.

SILVA-NUNES, M. DA *et al.* The Acre Project: The epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. **Cadernos de Saude Publica**, v. 22, n. 6, p. 1325–1334, 2006.

TAVARES-NETO, J. *et al.* Pesquisa de anticorpos contra arbovírus e o vírus vacinal da febre amarela em uma amostra da população de Rio Branco, antes e três meses após a vacina 17D. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 1, p. 1–6, 2004.

THOISY, B. DE *et al.* Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1326–1329, 2003.

VASCONCELOS, P. F. *et al.* Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, v. 17 Suppl, p. 155–164, 2001.

SOBRE O ORGANIZADOR

RENAN MONTEIRO DO NASCIMENTO - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado da Bahia - UNEB (2013). É Especialista em Gestão do Trabalho Pedagógico pela Faculdade Vale do Cricaré - FVC (2013); Especialista em Meio Ambiente e Sustentabilidade pela Faculdade Vale do Cricaré - FVC (2014); Possui Especialização em Análises Clínicas e Microbiologia pela Universidade Candido Mendes - UCAM (2016); Obteve seu mestrado em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC (2016). Em 2012 foi pesquisador do Laboratório de Biologia da UNEB; De 2014 a 2016 atuou como pesquisador no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) da UESC. Desenvolveu pesquisas na área de Microbiologia, Genética Molecular e Biologia Evolutiva, atuando principalmente nas seguintes linhas: microrganismos patogênicos presentes na água; citogenética animal de himenópteros; filogenia e evolução molecular de meliponíneos. Foi Docente no Ensino Fundamental no Colégio Alfa da Rede Pitágoras lecionando a disciplina de Ciências (2013-2014). Possui experiência no Ensino Médio ministrando a disciplina de Biologia no Colégio Polivalente de Caravelas (2017). De 2017 a 2020 foi professor no Centro Territorial de Educação Profissional do Extremo Sul (CETEPES) nas seguintes disciplinas: Biologia; Química; Anatomia e Fisiologia Humana; Bioquímica Básica; Imunologia Básica; Histologia; Hematologia; Bacteriologia; Microbiologia; Parasitologia; Biossegurança; Políticas Públicas em Saúde; Físico-Química; Metodologia do Trabalho Científico; Gestão de Qualidade, Saúde e Meio Ambiente; Monitoramente, Controle e Manutenção Ambiental; Aspectos e Impactos Ambientais. Foi Professor Substituto na Universidade Federal do Sul da Bahia - UFSB (2018-2020) atuando como Professor Tutor no Colegiado de Medicina da UFSB e lecionando as seguintes disciplinas: Biologia Celular; Genética Básica; Histologia e Embriologia; Concepção e Formação Humana; Sistemas de Controle Homeostáticos e Alostáticos; Bases Morfofuncionais Humanas. Atualmente cursa o Doutorado em Patologia Molecular na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e é pesquisador no Laboratório de Virologia e Química de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas (IB) na UnB. O autor tem se dedicado a desenvolver estudos na linha de pesquisa “Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos” realizando um mapeamento metagenômico e proteômico dos vírus e outros patógenos de morcegos para futuras publicações em periódicos nacionais e internacionais.

ÍNDICE REMISSIVO

A

B

C

D

E

R

S

T

V

Z

MICROBIOLOGIA:
Clínica, Ambiental e Alimentos

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Ano 2021

Microbiologia:

Clínica, Ambiental e Alimentos

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

@atenaeditora

www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Ano 2021